

**MARCOS ELVÉCIO BATISTA**

**COMPARAÇÃO ENTRE QUATRO TRATAMENTOS OFTÁLMICOS TÓPICOS NA  
CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CORNEANAS EM COELHOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Professor Dr. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk.

**CURITIBA  
2005**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Federal do Paraná, mais especificamente ao departamento de Medicina Veterinária e ao Hospital Veterinário pela cessão do espaço físico mínimo destinado ao desenvolvimento das atividades experimentais. Agradeço também aos funcionários do hospital que colaboraram com este experimento, estendo estes agradecimentos à aluna egressa deste curso Dra. Graziela Muller pelo auxílio, compreensão e orientação, agradeço aos meus sócios Fábio Francisco Baptista de Queiroz e Haine Strasbach de Queiroz, farmacêuticos que se esmeraram para a formulação dos colírios e pomada utilizados neste experimento, sem dúvida, ação fundamental para a conclusão desta experimentação. Agradeço de forma muito especial a minha esposa Priscila Maria Batista, farmacêutica, que nunca se negou a me auxiliar na instilação de colírios, realização de cirurgias, cuidados com os animais, sendo a melhor enfermeira, auxiliar cirúrgica e tratadora dos animais que eu podia esperar. Certamente sem ela nada poderia ser realizado, não posso esquecer de meus pais pelo constante apoio e incentivo e finalizo estendendo meus sinceros agradecimentos ao meu orientador e amigo, Prof. Felipe Wouk, que certamente se desdobrou para apoiar este orientado, encampando o objetivo de produzir uma aceleração na cura de uma das mais freqüentes doenças corneanas em animais domésticos, e o conseqüente bem estar dos mesmos.

***“Aqueles que utilizam sempre os mesmos velhos remédios para tratar as constantes novas doenças, são certamente os maiores promotores da estagnação evolutiva”.***

**Sir Francis Bacon – adaptado.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	5
<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	5
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	6
<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 OBJETIVO GERAL.....	9
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
<b>2 PROPRIEDADES TERAPEUTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE GIRASSOL</b> .....	12
2.1 AÇÃO CELULAR DO ÓLEO DE GIRASSOL.....	13
2.2 PROPRIEDADES DO ÁCIDO LINOLÉICO.....	15
<b>3 CÓRNEA, MORFOLOGIA, AFECÇÕES, REPARAÇÃO E CICATRIZAÇÃO</b> .....	16
3.1 TRATAMENTOS CLÍNICOS DAS ÚLCERAS CORNEANAS.....	18
3.2 O ÓLEO DE GIRASSOL ASSOCIADO AO CIPROFLOXACINO 0,3% EM COLÍRIO E POMADA OFTÁLMICA NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS CORNEANAS EM COELHOS.....	22
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTERILIZAÇÃO .....	29
<b>5 RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TRATAMENTOS</b> .....	33
5.1 DESENVOLVIMENTO FARMACOLÓGICO.....	33
5.2 RESULTADOS CLÍNICOS E HISPATOLÓGICOS DOS QUATRO TRATAMENTOS AVALIADOS.....	34
5.2.1 Grupo 1: Tratamento com ciprofloxacino 0,3% isolado com (Cixolan®).....	34
5.2.2 Grupo 2: Tratamento com ciprofloxacino 0,3% associado ao sulfato de condroítina 20%.....	35
5.2.3 Grupo 3: Tratamento com ciprofloxacino 0,3% associado ao óleo de girassol.....	37
5.2.4 Grupo 4: Tratamento com pomada oftálmica lanolina/vaselina e óleo de girassol (1/2) associado ao ciprofloxacino 0,3%.....	38
5.2.5 Análise do grupo 7 dias.....	40
5.2.6 Análise do grupo 14 dias.....	44
5.2.7 Análise dos grupos 21 e 42 dias.....	46
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	47
6.1 COLÍRIO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO.....	47
6.2 POMADA OFTÁLMICA EXPERIMENTAL DESENVOLVIDA.....	47
6.3 COMPARAÇÃO CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA .....	48
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
<b>ANEXOS</b> .....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Teste de Fluoresceína em 7 dias de tratamento.....	40
TABELA 2	- Resultados do teste de Kruskal-Wallis – Grupo 7 dias.....	42
TABELA 3	- Teste de d. m. s. – Grupo de 7 dias.....	43
TABELA 4	- Teste de Fluoresceína em 14 dias de tratamento.....	44
TABELA 5	- Resultados do teste de Kruskal-Wallis – Grupo 14 dias.....	45
TABELA 6	- Teste de d. m. s. – Grupo de 14 dias.....	45
TABELA 7	- Posologia dos tratamentos utilizados.....	59
TABELA 8	- Comparação de preços entre os tratamentos avaliados.....	59

## LISTA DE SIGLAS

AGE	- Ácidos graxos essenciais
LDL	- Lipídeos de baixa densidade
ISOL	- Colírio de ciprofloxacino isolado
COND	- Colírio de ciprofloxacino associado a condroitina 20%
GIRA	- Colírio de ciprofloxacino associado ao óleo de girassol
POM	- Pomada de ciprofloxacino associada ao óleo de girassol
AL	- Ácido linoléico
D.M.S	- Diferença mensurável significativa.

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Avaliação do teste de Fluoresceína com 7 dias de tratamento.....	41
GRÁFICO 8 - Avaliação do teste de Fluoresceína com 14 dias de tratamento.....	45

## RESUMO

Realizou-se o presente estudo com o objetivo de comparar os efeitos de quatro tratamentos oftálmicos tópicos sobre a cicatrização de úlceras corneanas cirurgicamente produzidas em coelhos. A base do produto avaliado é o óleo de girassol, escolhido para esta função em decorrência de seu retrospecto positivo sobre cicatrização de úlceras indolentes em humanos e animais. O produto foi formulado a partir do extrato oleoso de girassol puro em pomada oftálmica e colírio, sendo este o veículo para a diluição do ciprofloxacino 0,3% antibiótico quinolônico presente na formulação. Como tratamento controle usou-se o ciprofloxacino 0,3% isolado e com veículo inerte (ciloxan®) e compararam-se os resultados com uma formulação de ciprofloxacino 0,3% associada ao sulfato de condroitina 20% (ciprovet®), para embasar a ação cicatrizante. Os resultados da comparação destes quatro tratamentos demonstraram que tanto a pomada quanto o colírio formulados com o óleo de girassol cicatrizaram as úlceras em tempo 30% menor em comparação ao tratamento controle e com o mesmo tempo que a formulação de ciprofloxacino e condroitina, qualificando o óleo de girassol como um veículo adequado ao tratamento de úlceras corneanas em coelhos, pois abreviou sensivelmente o período de cicatrização das úlceras corneanas em comparação a um veículo inerte produzindo efeitos similares aos de uma formulação já consagrada para este fim, porém, com vantagens fármaco econômicas.

**Palavras chave:** Úlceras de córnea, oftalmologia, cicatrização corneana, colírios experimentais.

## ABSTRACT

The present study was done as to compare the effects of four ophthalmic topic treatments, about corneal ulcers healing chirurgic produced in rabbit's eyes. The assessed product base is the sunflower oil, chosen for that matter for its positive retrospect about indolent ulcers healing in humans and animals. The product has compound from pure sunflower oil extract in ophthalmic ointment and eye drops. This is the vehicle for the dilution of ciprofloxacin 0,3%, quinolonic antibiotic in the formulation. As control treatment ciprofloxacin isolated (ciloxan®) and with inert vehicle was used. The results were compared with a ciprofloxacin associate to condroitin 20% (ciprovvet®). The comparison results of this four treatments indicated that either the ointment or the eye drops formulated with sunflower oil healed the ulcers in 30% less time when compared to the control treatment and in as much time as the ciprofloxacin plus condroitin formulation, classifying the sunflower oil as an adequate vehicle for the treatment for corneal ulcers in rabbits, for it grows down the corneal ulcers healing period when compared to inert vehicle. It's produced similar effects when compared to a traditional formulation (ciprovvet®), however with farmacoeconomic advantages.

Key-words: Corneal ulcers, ophthalmology, corneal healing, experimental drop eyes.

## 1 INTRODUÇÃO

A córnea é vista como a porção óptica mais importante do olho, por possuir a capacidade de refração e transmissão da luz, devido a sua curvatura e sua transparência. Por isso, é importante o conhecimento das doenças e de seu tratamento, para que as espécies tenham uma boa função ocular.

As úlceras de córnea são lesões graves que acometem praticamente todos os animais domésticos e ao homem, apresentando-se normalmente contaminadas por bactérias gram-negativas, como o *Pseudomonas aeruginosa*, que devido a sua virulência e patogenicidade, tendem a agravar estas úlceras, através de seu efeito colagenolítico. A cicatrização destas lesões é fundamental para o desaparecimento dos sinais clínicos e restabelecimento das funções normais da córnea.

Considerando o retrospecto do óleo de girassol como substância notavelmente cicatrizante para tecidos cutâneos, cogitamos a hipótese de que este princípio repetiria, ao nível de tecido córneo, alguns de seus efeitos de cicatrização, tornando-se assim um aliado no controle desta lesão, como veículo de outras drogas, tais como antibióticos, neste caso especificamente o cloridrato de ciprofloxacino 0,3%, antibiótico quinolônico que complementa as ações cicatrizantes do óleo de girassol com um amplo espectro bactericida.

Entendemos que esta lesão ulcerativa carece de novos componentes farmacológicos que se integrem ao arsenal já existente, para continuamente procurarmos novos e mais eficazes meios de combater lesões ulcerativas corneanas, tanto em animais como no homem.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Através de nossos estudos relativos aos tratamentos usuais de ulcerações corneanas em animais domésticos, demonstraremos que existem espaços farmacológicos a serem preenchidos em quesitos como o de um veículo com maior período de permanência sobre a córnea (maior biodisponibilidade oftálmica), facilitando a posologia. Buscamos a atenuação nos custos do tratamento implementado (fatores farmacoeconômicos relevantes em medicina veterinária); biosegurança e alta tolerabilidade de preparações oftalmológicas para o combate de

ulcerações com as mais diversas etiologias e sobretudo, uma abreviação no período de cicatrização das úlceras corneanas em animais domésticos, fator fundamental na busca do sucesso terapêutico no manejo de úlceras corneanas.

Objetivaremos realizar um levantamento bibliográfico apto sobre a alta incidência e importância clínica como emergência médica, das ulcerações corneanas nos animais domésticos, assim como os seus respectivos subtipos e tratamentos convencionais indicados.

Com o intuito de desenvolver um colírio e uma pomada oftálmica que possuem como veículo o óleo de girassol associado ao ciprofloxacino 0,3% e compararmos seus efeitos cicatrizantes sobre úlceras corneanas profundas iatrogenicamente produzidas em coelhos, a outros dois tratamentos clássicos já estabelecidos, como o colírio de ciprofloxacino 0,3% isolado (1), que será o tratamento controle pelo veículo inerte e o colírio de ciprofloxacino associado com o sulfato de condroitina A 20% (2), objetivamos demonstrar com este trabalho que o óleo de girassol produz, sobre a cicatrização corneana, os mesmos efeitos clássicos já consagrados no uso tópico, no sentido de uma abreviação no período de cicatrização de feridas e úlceras indolentes.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pontuar as ações sobre a cicatrização corneana de um colírio e uma pomada oftálmica compostos pelo óleo de girassol, associado com ciprofloxacino 0,3% e comparar os seus efeitos terapêuticos sobre úlceras corneanas profundas a outros dois tratamentos oftálmicos já consagrados para o mesmo objetivo, sendo eles o colírio de ciprofloxacino 0,3% <sup>1</sup> isolado que será tratamento controle e o colírio de ciprofloxacino 0,3% associado com o sulfato de condroitina 20% <sup>2</sup>.

- Avaliar o processo de desenvolvimento farmacotécnico e os resultados terapêuticos de um colírio e pomada oftálmica, seguindo todas as etapas farmacotécnicas clássicas segundo os trabalhos de (NOGUEIRA et al., 1980), compostos pelo óleo de girassol, associado com ciprofloxacino 0,3%.

---

<sup>1</sup>Ciloxan®, laboratório Alcon farmacêutico. São Paulo - SP

<sup>2</sup>Ciprovet®, Labyes S.A. Buenos Aires, Argentina.

- Considerar as possibilidades de industrialização e ou produção em laboratório de manipulação de estéreis do colírio e pomada oftálmica desenvolvidos, sob os pontos de vista farmacotécnicos, farmacoeconômicos e terapêuticos.
- Concluir se o veículo oleoso e o veículo cremoso realmente diminuem a frequência posológica do tratamento clássico para úlceras corneanas.
- Avaliar as ações do colírio e da pomada oftálmica sobre os animais tratados, sob o ponto de vista terapêutico, tolerabilidade, reações adversas e super-dosagem.

## 2 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE GIRASSOL

O extrato da semente de girassol ou óleo de girassol, quando extraído a frio, possui amplas indicações como suplemento nutricional e como agente antioxidante (PRESS., 1975). Os mesmos autores observaram que o uso tópico regular do óleo de girassol em seres humanos, aplicado em extremidades (mãos e pés), proporciona uma diminuição dos níveis de lipídeos séricos de baixa densidade (LDL). Contudo, após esta constatação, o enfoque sobre as ações orgânicas deste óleo ficou praticamente restrito ao âmbito nutricional. Seus efeitos clássicos foram amplamente estudados sistemicamente, com experimentos realizados pelo uso oral, e ou, associados a dietas alimentares especiais (PRESS., 1975).

Pesquisadores, descreveram os benefícios cicatriciais, quando do uso destes compostos ricos em ácidos graxos essenciais em lesões epidérmicas, tais como escaras de decúbito ou úlceras indolentes (DECLAIR e CARMONA., 1994; JEZYK et al., 1977).

Estudos dermatológicos mais recentes confirmaram as ações deste óleo rico em triglicérides de cadeia média, como a base para o desenvolvimento de compostos promotores da aceleração no processo de cicatrização de lesões de pele e mucosas (DECLAIR e CARMONA., 1994).

Nesta linha, achados citológicos e histológicos revelaram uma evidente abreviação no processo de reepitelização de tecidos, sinalizando que os ácidos graxos essenciais (AGE), presentes em grande quantidade no óleo de girassol, participariam também com ações tópicas, e não somente pela via sistêmica (BURR e BURR., 1979).

Sua composição físico-química é a de um óleo claro, levemente amarelado, com pH entre 6 e 6,3 (pH correspondente ao extrato oleoso extraído a frio), com padrões organolépticos palatáveis, tendo um odor suave. Possui em sua composição bromatológica média: ácido linolênico 0,1%, ácido linoléico 0,2%, ácido oléico 21,3%, ácido palmítico 6,4%, ácido esteárico 1,3%, vitamina E 75mg/100grs (SHEPHERD e LYNN., 1986). Estes componentes possuem um comprovado efeito benéfico ao sistema cardiovascular, no combate a radicais livres, como doadores de AGE (ácidos graxos essenciais), o que denota todo seu efeito sistêmico sobre a

manutenção e integridade de tecidos cutâneos, em especial da pele, mucosas e pêlos de pequenos animais (VAN DORP., 1990).

## 2.1 AÇÃO CELULAR DO ÓLEO DE GIRASSOL

A ação exercida pelo óleo de girassol sobre a pele é a da formação de tecido de granulação, provavelmente secundário as suas ações quimioterápicas promotoras de diferenciação epidérmica e conseqüente cicatrização. Podemos descrever o processo de reparação tecidual em uma determinada seqüência de eventos, incluindo a indução ao processo inflamatório agudo pela própria lesão, regeneração das células parenquimatosas, migração e proliferação do tecido cognitivo e componentes parenquimatosos, colagenização e aquisição de força tensional. Este processo fisiológico pode ser dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e remodeladora. A resposta inflamatória está diretamente ligada ao processo de reparação tecidual. Na verdade, o processo de reparação inicia-se durante a fase inicial da resposta inflamatória. Os sinais clássicos da inflamação caracterizam-se por rubor, calor, dor, tumor e perda de função. A resposta fisiológica inclui migração e adesão leucocitária, vasodilatação, quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, fagocitose, liberação de fatores de crescimento e liberação de eicosanóides, os quais são derivados dos ácidos graxos essenciais (MILLER., 1996).

Os eicosanóides são considerados mediadores inflamatórios que estimulam a resposta inflamatória, como a vasodilatação e agregação plaquetária, e também atuam como agentes quimiotáticos, os quais são componentes indutores da resposta quimiotática e da mobilidade de polimorfonucleados (PMNs), mais especificamente dos leucócitos (KOCH et al., 1974). A liberação de produtos inflamatórios pelo sistema de complemento e a ativação de plaquetas e células endoteliais contribuem para o recrutamento de fibroblastos e o início da fase proliferativa (PARRY e CRAIG., 1984).

Macrófagos infiltram-se na ferida, os quais são quimiotáticos para o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e para o PGF- $\beta$  (fator de crescimento de plaquetas  $\beta$ ) que, por sua vez, contribuem com o recrutamento de fibroblastos para área da lesão (PARRY e CRAIG., 1984). Como resultado deste recrutamento e

proliferação, ocorre o acúmulo de fibroblastos, os quais são regulados pelo FGF (fator de crescimento do fibroblasto).

Plaquetas, macrófagos e neutrófilos produzem uma série de polipeptídios, ou fatores de crescimento, que são mitogênicos para o fibroblasto e para as células endoteliais. Estes fatores de crescimento são produzidos seguindo a ativação da célula por vários estímulos no ambiente inflamatório (PARRY e CRAIG., 1984).

A produção de IL-1 (interleucina-1) é ativada pelos monócitos/macrófagos e exerce importante papel na neovascularização e reparação tecidual, em colaboração com o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral - $\alpha$ ). Os macrófagos também produzem PDGF, os quais têm atividade quimiotática para leucócitos e fibroblastos, além de promoverem o crescimento dos fibroblastos, que possuem alta afinidade pelos receptores de proteinoquinase (KOCH et al., 1974).

Macrófagos, FGF, PDGF e TGF- $\beta$  promovem a atividade angiogênica necessária para a formação do tecido de granulação, da proliferação de fibroblastos e para a formação da síntese da matriz celular.

É importante lembrar que os fibroblastos são responsáveis pela formação de colágeno, fibronectina e outros componentes da matriz celular, tendo uma potente atividade angiogênica. A estimulação da síntese da matriz celular pelo fibroblasto, através da IL-1, TNF e PDGF, leva à reparação tecidual e à formação da cicatriz (GAUGHAN e BURR., 1994).

Segundo (BURR e BURR., 1979), a carência crônica de AGE na dieta de animais promove inúmeras alterações epidérmicas, com perda de elasticidade e capacidade de regeneração e cicatrização. Já (SHEPERD e LYNN., 1986), descreveram uma abreviação no período cicatricial ao compararmos o processo regenerativo com e sem a utilização tópica de AGE. (SINCLAIR., 1989), descreveram uma dermatose característica, que ocorria devido ao aumento de perda de fluído intracelular e intersticial, secundária a uma deficiência de AGE; (VAN DORP., 1990) demonstraram a regressão e cura desta dermatose apenas com a aplicação tópica de ácido linoléico (AL) sobre as lesões de pele.

Ao nível celular, (DECLAIR e CARMONA., 1994) evidenciaram que os AGE promovem um claro efeito quimiotático sobre os tecidos, atraindo leucócitos e neutrófilos ao local lesionado, além de proporcionar um incremento no processo de neovascularização e angiogênese, condições básicas para regenerar tecidos e debelar agentes infecciosos. Em suma, a ação dos AGE presentes em grandes

quantidades no óleo de girassol sobre tecidos epidérmicos podem ser justificadas pelas suas ações sobre a regulação osmótica ao nível de membrana celular, sua ação antioxidante bloqueando a ação de radicais livres sobre as células epidérmicas, sua ação facilitatória sobre o transporte de gorduras transmembrana, sua ação imunógena local, devido ao seu efeito quimiotáxico para leucócitos e neutrófilos, mas principalmente por serem o AGE precursor das substâncias farmacologicamente ativos fundamentais para a realização do processo de diferenciação e divisão celular, tais como os tromboxanos, prostaciclina e prostaglandinas, alterando, conseqüentemente, funções imunológicas, resultando em uma aceleração no processo de granulação tecidual.

## 2.2 PROPRIEDADES DO ÁCIDO LINOLÉICO

As ações do ácido linoléico sobre o tecido cutâneo e mais precisamente sobre a granulação e cicatrização de tecidos cutâneos, foram largamente demonstradas por (DECLAIR e CARMONA., 1994), em uma série de estudos randomizados, multicêntricos, duplo-cegos e placebo-controlados, nestes estudos abrangendo um total de 112 indivíduos portadores de úlceras crônicas de diferentes etiologias, objetivou-se verificar a capacidade do ácido linoléico (AL) em estimular o tecido de granulação e cicatrizar feridas crônicas e recentes, avaliando também os efeitos colaterais e a tolerabilidade do paciente ao tratamento. As lesões tratadas com ácido linoléico mostraram diferença significativa no desenvolvimento do tecido de granulação e cicatrização por ANOVA com  $p < 0,001$ . Das úlceras tratadas com AL, 100% granularam até a segunda semana e 90,4% cicatrizaram. Das tratadas com placebo, 1,5% apresentaram tecido de granulação na quarta semana e 1,5% cicatrizaram. Não se observou efeito colateral severo e o tratamento foi bem tolerado.

Dentre o grupo dos ácidos graxos essenciais, o linoléico evidencia-se como o mais efetivo na indução cicatricial e reparativa, sendo este composto encontrado em altas concentrações no extrato oleoso da semente de girassol extraída a frio, motivo que norteou sua seleção como doador natural desta respectiva substância aos tecidos cutâneos.

### **3 A CÓRNEA, MORFOLOGIA, AFECÇÕES, REPARAÇÃO E CICATRIZAÇÃO**

A córnea de coelhos e cães possuem similaridades. Ambas são recoberta por um filme lacrimal, formando uma janela através da qual a luz penetra o globo. A córnea tem cerca de 0,6-0,8mm de espessura e consiste de cinco camadas, sendo elas: o filme lacrimal, epitélio, estroma, Descemet e endotélio. O epitélio que forma a camada externa tem a espessura de 7-12 células no centro e é levemente mais fino na periferia, onde emerge o epitélio conjuntival. Sua camada de células basais consiste de células epiteliais cubóides que se dividem continuamente. Quando as células amadurecem e progridem para a superfície (cerca de sete dias), elas se tornam progressivamente mais planas. As células mais externas do epitélio são células grandes, planas, poligonais com microvilos. A camada mucosa do filme lacrimal é firmemente ligada a essas células. Vitaminas A e C são importantes para a adesão intercelular. A camada de células basais é separada do estroma por uma fina membrana basal a qual está ligada a camada de células basais por hemidesmossomas (GILGER et al., 1991).

O estroma constitui cerca de 90% da espessura da córnea. Ele é composto de feixes de fibras de colágeno, fibroblastos e substância adesiva. As fibras ficam precisamente paralelas dentro dos feixes, enquanto que os próprios feixes se cruzam entre si. Posterior ao estroma fica a membrana elástica de Descemet (membrana limite posterior). O lado interno da córnea é coberto por uma camada única de células, a qual, em razão das suas propriedades endoteliais, é chamada de endotélio corneano (HOFFMAN., 1972).

A córnea é provida com uma rede de nervos (ramos sensitivos não mielinizados do nervo ciliar longo, que é um ramo da divisão oftálmica do nervo trigêmeo) que passam para o estroma da esclera. Pequenos ramos, não tendo nem bainha de mielina, nem células de Schwann, penetram entre as células epiteliais (RASK et al., 1980).

A forma do limbo na maioria dos animais é circular a ovalada horizontal, como observada nos ungulados. Em cavalos, a córnea perlímbica freqüentemente parece esbranquiçada; alguns autores atribuem isso ao ligamento pectíneo/sistema trabecular que não é totalmente coberto pela esclera. A esclera opaca; que é branca exceto por alguma pigmentação leve na área límbica, forma o restante da túnica externa do olho. A esclera é mais espessa (1,5mm) na área do plexo venoso, 3-

10mm atrás do limbo, e é mais fina (0,2mm) no equador, tornando-se novamente espessa quando se aproxima da saída do nervo óptico (WALDE., 1983). Com o objetivo de funcionar como uma janela e como parte de um meio altamente refrativo, a córnea deve ser transparente. Ela é clara em consequência da regularidade das fibrilas de colágeno do estroma com cerca de 81% de hidratação e de sua ausência de vascularidade. Uma hidratação estável da córnea é determinada principalmente por um mecanismo de bomba no endotélio. A córnea é relativamente “desidratada”; quando o endotélio é lesado, a córnea absorve uma grande quantidade de água, que aumenta sua espessura 3-4 vezes. Quando há lesão epitelial, a espessura pode dobrar e o edema é restrito a essa área. A absorção de água também distorce a regularidade das fibrilas, resultando em opacidade irregular e uma superfície ondulada. Em razão da ausência de vasos na córnea, o recebimento de nutrientes e a remoção de impurezas ocorrem no limbo e via filme lacrimal e humor aquoso (ÜBERREITER., 1961).

Em coelhos observamos uma porção única da túnica fibrosa mais externa do olho, a córnea é transparente e sua maior função é refrativa enquanto mantém uma barreira física dura e impermeável entre o olho e o ambiente. A córnea é exposta aos perigos ambientais, já que ela pode manter uma superfície externa lisa necessária para a formação da imagem retiniana. Isto é alcançado pela reposição contínua do epitélio superficial e pela manutenção do filme lacrimal pré-ocular em sua superfície (com o auxílio do sistema lacrimal e pálpebras). Respostas patológicas da córnea são usualmente associadas à perda de transparência. Felizmente, as doenças corneanas, em sua maioria são passíveis de terapia médica ou cirúrgica (GILGER et al., 1991).

Em coelhos e cães, a córnea consiste de epitélio externo, membrana basal, estroma, membrana de Descemet e endotélio. A transparência corneana depende da ausência de vasos sanguíneos e pigmento de seu epitélio superficial anterior não ceratinizado, da organização das camadas do estroma, e do pequeno diâmetro das fibrilas colágenas do estroma. O endotélio corneano utiliza uma bomba fisiológica ativa para remover e transportar fluido para a câmara anterior (SLATTER et al., 1977). Deste modo, o endotélio corneano regula a hidratação da matriz colágena estromal corneana, a qual fornece resistência mecânica. As células endoteliais normalmente formam um padrão mosaico hexagonal na membrana de Descemet (como visto clinicamente pela microscopia especular). Estas células endoteliais, em

coelhos e cães, em formato hexagonal tendem a se tornar maiores, mas diminuem em número com a idade. No cão jovem, o número de células endoteliais é em média 2.500 a 2.800 por  $\text{mm}^2$ , em coelhos jovens, em média 2.000 a 2.300 por  $\text{mm}^2$ . Estes achados sugerem que, semelhante ao gato e primatas não-humanos, o cão e o coelho tem uma habilidade limitada para a regeneração endotelial corneana (e principalmente em animais jovens). A espessura da córnea central no cão é  $0,558 \pm 0,076$  mm, e a córnea periférica dorsal  $0,617 \pm 0,073$  mm, em coelhos, esta espessura é de  $0,328 \pm 0,046$  mm, e a córnea periférica dorsal,  $0,411 \pm 0,063$  mm (GILGER et al., 1991).

Ulceração corneana é uma das doenças oculares mais comuns no cão. Úlceras superficiais não complicadas cicatrizam rapidamente, e com mínima formação de cicatriz. Úlceras profundas complicadas podem prejudicar a visão por causa da cicatrização corneana ou, quando ocorre perfuração corneana, em razão da formação de sinéquias anteriores. Ceratite ulcerativa grave pode levar à perda do olho por causa de endoftalmite, glaucoma, *phthisis bulbi* ou alguma combinação destes fatores citados (ÜLRICH et al., 1771). Úlceras corneanas são classificadas pela profundidade do envolvimento corneano (superficial, estromal profunda e descemetocel) e pela causa (PALSEN et al., 1987).

No caso dos coelhos, ulcera corneana simples/não complicada (rasa) usualmente ocorre secundariamente a um trauma menor, autotraumatismo, uso de xampus, e até mesmo por anormalidades nos cílios, na estrutura e função palpebral e doenças no filme lacrimal pré-ocular, os quais usualmente se resolvem com antibiótico tópico aplicado três a quatro vezes ao dia para prevenir infecção bacteriana. Em adição, atropina 1% é aplicada para controlar o espasmo do músculo ciliar e o desconforto ocular associado e para induzir midríase, assim diminuindo a probabilidade de formação de sinéquias. Aplicação excessiva, no entanto, pode diminuir a produção lacrimal. Preparações oftálmicas contendo neomicina, bacitracina e polimixina B são recomendadas. A úlcera deve resolver-se em 2 a 6 dias, caso contrário, deve ser reavaliada na busca de uma causa subjacente não detectada ou um fator contribuinte (PALSEN et al., 1987).

### 3.1 TRATAMENTOS CLÍNICOS DAS ÚLCERAS CORNEANAS

O tratamento clínico das ulcerações corneanas possui alguns protocolos fundamentais para a sua efetivação, contudo, seguem com protocolos similares entre as diferentes espécies de animais domésticos. Ações terapêuticas, tais como a administração de antibióticos de amplo espectro tópicos. Alguns são levemente epiteliotóxicos; por isso, devem ser administrados em baixa frequência (isto é, duas a três vezes ao dia). Atropina 1% como um cicloplégico para dor ocular aguda, usualmente por três a cinco dias. O desbridamento do epitélio não aderido, com ou sem agentes químicos. Utilizar aplicadores com ponta de algodão secos, uma lâmina de bisturi, uma espátula opaca (por exemplo, espátula de Kinura de platina, espátula de íris), ou uma pinça de dente fino. Após a córnea ter sido topicamente anestesiada, todo o epitélio solto é removido, normalmente até 1 a 2 mm além da margem de retenção de fluoresceína. Por isso, não é incomum ter uma área extensa de epitélio anormal e grande aumento do tamanho da úlcera após o desbridamento. Pode haver a necessidade de repetir o desbridamento a cada 3 a 14 dias, mas a quantidade de epitélio solto deve diminuir a cada remoção, conforme a úlcera cicatriza. Agentes utilizados no desbridamento químico incluem ácido tricloroacético, fenol, tintura de iodo e iodo povidona diluído (GWIN et al., 1983).

Úlceras estromais profundas, no caso dos coelhos, são as que atingem mais que a metade da espessura corneana e podem ser divididas em progressivas e não-progressivas. Úlceras profundas não-progressivas são manejadas medicamentosamente, da mesma maneira que as úlceras superficiais, mas possivelmente com um recobrimento conjuntival ou enxerto suturado à margem da úlcera também. Intervenção cirúrgica é indicada para as úlceras estromais progressivas, profundas (2/3 a 3/4 de perda de estroma), e para descemetoceloses (GWIN et al., 1983). Os procedimentos cirúrgicos mais comumente utilizados nestes casos incluem enxertos e recobrimentos conjuntivais. Procedimentos menos frequentes incluem a transposição corneoescleral, adesivos teciduais corneanos e transplantes de córnea (WARING et al., 1986).

Adesivo tecidual à base de butilcianoacrilato<sup>3</sup> tem sido utilizado no tratamento de úlceras estromais profundas, descemetoceloses, pequenas perfurações e úlceras corneanas refratárias no cão e em coelhos. O procedimento para aplicação do adesivo tecidual envolve anestesia tópica (se anestesia geral não for usada);

desbridamento do defeito (conforme necessário); secar o local com swab de algodão, esponjas de celulose ou com ar quente (isto é, secador de cabelos); aplicar uma fina camada do adesivo tecidual através de uma agulha de calibre 30; e evitar o piscar por 15 a 60 segundos (enquanto o cianocrilato solidifica). Deve-se ter o cuidado de aplicar somente a mínima quantidade do adesivo.

Úlceras estromais profundas progressivas em animais domésticos são potencialmente ameaçadoras para a visão e para o bulbo, sendo assim a terapia deve ser agressiva. Antibióticos são freqüentemente selecionados com base em citologia, culturas e antibiograma. Atropina tópica 1% é administrada para minimizar o desconforto do espasmo do músculo ciliar e para prevenir a formação de sinéquias, caso o estroma apresentar-se em “melting”, ou seja, em fase de liquefação, lança-se mão de intensa antibioticoterapia tópica (a cada 1-2 horas), e o espectro do antibiótico deve incluir bacilos gram-negativos, tais como a *Pseudomonas sp.* Os antibióticos de escolha são a tobramicina ou ciprofloxacina. Preparações anticolagenase tópicas, tais como a acetilcisteína, soro sangüíneo, ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) e heparina podem ser também instiladas (MARTIN., 1981).

Um enxerto ou recobrimento conjuntival é indicado para úlceras profundas progressivas para tratar a doença corneana de base, fortalecendo a córnea enfraquecida e evitando a perda da integridade corneana. Vários tipos de enxertos conjuntivais estão disponíveis. O enxerto conjuntival livre é um segmento de conjuntiva completamente separado de seu suprimento sangüíneo e do local doador, antes de ser transplantado para o local receptor na córnea. Recobrimentos conjuntivais, no entanto, são de avanço ou rotacionais que retêm o máximo de seu suprimento sangüíneo original. Enxertos corneanos utilizando tanto tecido corneano fresco quanto criopreservado também fornecem suporte e preenchem o defeito, sendo freqüentemente recobertos com um enxerto conjuntival, como observado em coelhos e cães, (MARTIN., 1981).

Descemetocelas são úlceras profundas com a membrana de Descemet exposta e perfuração iminente no bulbo. Em coelhos, a descemetocela é uma emergência ocular e requer intervenção cirúrgica imediata. Sutura direta tem sido recomendada para pequenas descemetocelas (diâmetro  $\approx$  3 mm), mas produz um alto grau de distorção corneana (astigmatismo). Uma limitação para a sutura

corneana é que o tecido corneano adjacente pode estar comprometido, edemaciado, não sendo forte o suficiente para segurar as suturas. Descemetoceloses maiores requerem enxerto conjuntival, enxertos corneoconjuntivais ou corneoesclerais, ou ainda um enxerto homogêneo corneano para fornecer suporte e apressar a cicatrização. Desses, o enxerto conjuntival ou os recobrimentos são as técnicas mais freqüentemente utilizadas (BELLHORN et al., 1967).

Úlceras corneanas são freqüentemente, em todas as espécies domésticas, de origem traumática. Contudo elas podem ser rapidamente contaminadas por bactérias. O diagnóstico é estabelecido com base na citologia, bem como na cultura e antibiograma das amostras corneanas. As bactérias mais comuns isoladas de olhos com doença externa incluem *Staphylococcus* sp (39%), *Streptococcus* sp (25%), *Pseudomonas* sp (9,4%), *Escherichia coli* (4,7%), *Corynebacterium* sp (3,9%) e *Bacillus cereus* (2,4%), (VERWER., 1965). *In vitro*, a maioria dos *Staphylococcus* sp é suscetível a bacitracina, gentamicina e cefalotina. A maioria dos *Streptococcus* sp é suscetível a cloranfenicol, eritromicina e carbenicilina. *Pseudomonas* sp é sensível a gentamicina, tobramicina e amicacina (VERWER., 1965).

Ceratites ulcerativas agudas com “melting” progressivo requerem vigorosa terapia tópica; antibióticos de amplo espectro apropriados e atropina 1% são aplicados. Inicialmente, poderá se realizar a limpeza da úlcera com solução de iodo povidona (diluída 50:50 em solução salina estéril ou colírio). O manejo bem-sucedido das úlceras em “melting” depende do controle da infecção e redução do impacto da colagenase e outras proteases na córnea. A efetividade dos inibidores de colagenase tópicos em úlceras corneanas no cão é questionável, mas os componentes testados até hoje incluem acetilcisteína, citrato de sódio, ascorbato de sódio, tetraciclina, peptídeos contendo thiol, EDTA cálcico, penicilamina, heparina e soro autógeno. Acetilcisteína e soro são os principais inibidores de protease usados clinicamente. Opções cirúrgicas incluem recobrimentos e enxertos conjuntivais, bem como transplante de córnea (CORK et al., 1978).

### 3.2 O ÓLEO DE GIRASSOL ASSOCIADO AO CIPROFLOXACINO 0,3% EM COLÍRIO E POMADA OFTÁLMICA NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS CORNEANAS EM COELHOS

Após a análise do retrospecto positivo do extrato oleoso da semente de girassol sobre a cicatrização de tecidos cutâneos e seus anexos (DECLAIR e CARMONA., 1994), e de situar-se a grande incidência e importância clínica das úlceras corneanas nos animais domésticos, além de revisar-se os protocolos convencionais mais utilizados no tratamento de úlceras corneanas (GWIN et al., 1983), idealizaram-se duas formas farmacêuticas que abrangessem as necessidades antibióticas e facilitadoras do processo cicatricial, sendo estas características encontradas em um colírio e pomada oftálmica à base de óleo de girassol associado ao ciprofloxacino, molécula de escolha pelo retrospecto favorável em uso oftalmológico (MILLER., 1996). Objetivou-se através destas preparações oftalmológicas estéreis, mensurar, através de testes clínicos e histopatológicos cabíveis os efeitos reais destas associações farmacológicas sobre as ulcerações corneanas e comparar um grupo de animais tratados com estas formulações a outros dois grupos submetidos a tratamentos convencionais. O objetivo de utilizarmos o óleo de girassol vai além de todas as suas características como excelente doador de AGES, que como citados anteriormente, são promotores da abreviação no período de cicatrização características outras, tais como a viscosidade e oleosidade inerentes aos compostos oleosos e pomadas, peculiaridades estas altamente desejáveis em medicina veterinária, tendo em vista a eventual dificuldade posológica de colírios e pomadas oftálmicas em animais domésticos. O desenvolvimento do colírio e da pomada oftálmica utilizados neste estudo respeitou as etapas farmacotécnicas padronizadas e estabelecidas por (NOGUEIRA et al., 1988). O processo farmacotécnico foi realizado por farmacêutico especialista em manipulação, em laboratório padrão para farmácia magistral. <sup>4</sup>

<sup>3</sup>(Cola corneana, Tri-Hawk Internacional\*, Ophthalmic Nexaband\*, CRX Medical\*).

<sup>4</sup> Dermofórmulas farmácia de manipulação®, Curitiba, PR.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### Os animais:

Foram utilizadas 64 coelhas (*Oryctolagus cuniculus*), selecionadas após verificação de higidez e ausência de afecção ocular prévia. Instaurou-se então, um tratamento prévio com vermífugos e coccidicidas, sendo a ivermectina injetável <sup>5</sup>, utilizada como vermífugo, na dose única de 0,5 µg subcutânea em todos os animais, associada com o sulfametoxazol mais trimetropim injetável <sup>6</sup>, na dose única de 10mg/ kg subcutâneo, da mesma forma em todos os animais. Os animais foram mantidos durante sete dias em processo de quarentena prévia para ambientação e adaptação ao ambiente e gaiolas do experimento, sendo que todas as coelhas, com idade adulta de 6 - 7 meses, e média de peso de 3 kg, todas não prenhas. Realizou-se, por fim, exame coproparasitológico por flutuação e verificou-se a inexistência de endoparasitas após sete dias da dose inicial dos vermífugos ministrados.

### Procedimento cirúrgico:

A produção da ulceração corneana iatrogênica, foi realizada através de procedimento cirúrgico, objetivando-se uma lesão corneana, sendo esta, padronizada através da delimitação subjetiva da distância da margem pupilar (DMP) no momento da anestesia, e produzida com auxílio de uma trefina (ver anexos página 66, foto 2) de 6 mm. (trefina para punch dermatológico adaptada), incisando-se a córnea transversalmente ao eixo pupilar. Esta incisão circular atingiu o estroma posterior e precedeu-se de uma marcação corneana prévia, seguida de movimentos circulares subjetivos, realizados com a trefina, até a visualização da penetração em estroma posterior. Após a realização da incisão circular, com o auxílio de uma pinça *Adson-Brown* e bisturi, escarificou-se o flap corneano delimitado, iniciando-se pelo bordo às doze horas e seguindo a trajetória circular do flap delimitado no sentido horário com auxílio do bisturi com lâmina número 24, até a liberação total do flap delimitado e a retirada posterior do mesmo resultando deste modo, na produção da ulceração corneana padrão desejada. Este procedimento, realizado sempre pelo mesmo profissional, foi conduzido sob magnificação de 10X em lupa cirúrgica, sendo os animais mantidos em jejum prévio de doze horas e submetidos a anestesia geral e local,

---

<sup>5</sup>Ivomec®, Hoescht veterinária, Rio de Janeiro, RJ.

<sup>6</sup>Borgal®, Hoescht veterinária, Rio de Janeiro, RJ.

induzida com a associação de quetamina <sup>7</sup>, na dose de 2mg/kg intramuscular e xilazina <sup>8</sup>, na dose de 10mg/kg intramuscular, aplicadas em intervalos de dois minutos entre as doses, na musculatura periespinal (músculo longo dorsal), a anestesia local foi realizada com o uso de colírio anestésico formulado a base de tetracaína 100mg/ml <sup>9</sup>, tendo sido instiladas duas gotas padrão sobre o olho, cinco minutos antes do início da cirurgia. Após o procedimento cirúrgico, administrou-se uma dose intramuscular de dipirona injetável <sup>10</sup>, na dose de 10mg/kg pela via subcutânea, com o objetivo de diminuir a dor no pós-operatório, sendo que uma segunda dose foi ministrada vinte e quatro horas após a cirurgia. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais padrão para coelhos de granja, nas instalações do hospital veterinário da UFPR, com água mantida *ad libitum*, e ração industrializada padrão para coelhos durante todo o período do experimento.

O acompanhamento do desenvolvimento da lesão corneana produzida, foi realizado diariamente, através de um exame específico oftalmológico, de acordo com MUNGER., (2002).

#### **Protocolo de avaliação clínica dos animais operados:**

Após o procedimento cirúrgico, iniciaram-se as avaliações clínicas para a determinação qualitativa e quantitativa dos tratamentos ministrados e seus respectivos resultados clínicos. Assim os animais foram avaliados diariamente com uso de iluminação artificial direta, quanto aos seguintes sinais clínicos: fotofobia, blefaroespasmos, quemose, hiperemia conjuntival, edema corneano, secreção/infecção, tecido linfóide, pannus oftálmico, Tyndall e finalizando a avaliação com o teste de fluoresceína. A escala de avaliação seguiu o parâmetro subjetivo de avaliação 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; 3 – intenso; 4 – muito intenso; 5 – grave (MUNGER., 2002).

---

<sup>7</sup> Quetalar®, Virbac saúde animal, São Paulo, SP.

<sup>8</sup> Rompun®, Bayer saúde animal, São Paulo, SP.

<sup>9</sup> Anestalcon®, Alcon laboratórios, São Paulo, SP.

<sup>10</sup> Novalgina®, Hoescht veterinária, Rio de Janeiro, RJ.

**Confecção das biópsias:**

Ao término dos respectivos períodos avaliados, (7, 14, 21 e 42 dias), dezesseis animais ao total (33,3%) foram destinados ao exame histopatológico, (provenientes de cada grupo avaliado). O procedimento foi realizado com os animais anestesiados sob o mesmo protocolo anestésico utilizado na cirurgia, para na seqüência serem eutanasiados com a aplicação de 10 ml de cloreto de potássio em bolus I.V.; Realizou-se então, a enucleação do olho tratado, sendo que os mesmos, foram fixados em solução de Bouin <sup>11</sup>, com aplicação prévia de 0,3 ml do fixador de Bouin, através de seringa intradérmica padrão de 1 centímetro cúbico descartável e estéril, no interior do globo ocular, sendo os globos oculares, na seqüência da aplicação, imersos durante quatro horas no fixador de Bouin, após este período, os globos oculares foram transferidos para uma solução de formol a 10% e mantidos nesta condição até serem remetidos ao laboratório de patologia veterinária da UFPR. O tecido para a biópsia corneana foi colhido no laboratório de patologia da UFPR, sob orientação do médico veterinário patologista, através da remoção delicada e minuciosa de parte de tecido sadio e parte de tecido doente, (zona de transição) limitando-se ao epitélio-estroma anterior. As colheitas foram realizadas nos intervalos de 7, 14, 21, e 42 dias, e a partir destas colheitas confeccionaram-se as lâminas para análise histopatológica.

**Preparação e avaliação histopatológica:**

Após a colheita e preparo inicial, o material foi conservado em solução neutra de formalina a 10%, para na seqüência, ser enviado ao laboratório<sup>12</sup>, para ser avaliado sob microscopia de luz com coloração de hemotoxilina-eosina e tricrômica de Masson. Nesse exame avaliaram-se parâmetros referentes a edema epitelial e estromal, presença de abrasão e células jovens epiteliais, neoformação vascular, infiltração de leucócitos mono e polimorfonucleares, proliferação de fibrócitos e rearranjo das fibras de colágeno, observados segundo observações descritas por (SPENCER., 1985) e (MARGOT., 1991). Estes parâmetros morfológicos foram avaliados no mesmo padrão utilizado para os sinais clínicos.

<sup>11</sup>Farmaquímica indús. e comérc. de prod. químicos Ltda. São Paulo, SP.

<sup>12</sup>Instituto Veterinário de Imagem® (I.V.I.), São Paulo, SP.

**Fármacos e doses:**

O fármaco utilizado é o extrato purificado da semente de girassol, esterilizado através de irradiação por raio gama. As formas farmacêuticas são as de um colírio e pomada oftálmica contendo 100% de óleo de girassol purificado, dispensando, por suas características físico-químicas, correção de pH para tornarem-se próximos ao neutro (pH entre 6 e 7). Contudo necessitou-se realizar uma correção de isotonicidade específica para se adequarem os níveis de osmolaridade, sendo então adicionado o antibiótico quinolônico ciprofloxacino na proporção de 0,3% do total de cinco mililitros do colírio e cinco gramas da pomada, obtendo uma dispersão durante a aditivção, requerendo no entanto uma freqüente agitação para manter a solubilidade do conteúdo decantado, ao contrário do observado na pomada oftálmica, que demonstrou alta solubilidade entre os componentes da fórmula. Na seqüência, o colírio foi acondicionado em frasco conta-gotas padrão na cor âmbar e a pomada acondicionada em tubo de alumínio. Os fármacos foram formulados em laboratório de farmácia de manipulação padrão <sup>13</sup>, previamente lacrados e remetidos a um laboratório terceirizado <sup>14</sup> para a esterilização por radiação gama. A dose inicial do colírio foi a de uma gota padrão em cada olho iatrogenicamente afetado, com posologia diária a cada doze horas, durante sete dias; no caso da pomada oftálmica a dose foi de um centímetro de pomada aplicado internamente à pálpebra inferior a cada doze horas, durante sete dias. Os animais dos grupos de comparação receberam no tratamento 2, ciprofloxacino 0,3% isolado, na posologia de uma gota padrão no olho afetado a cada seis horas e no grupo de tratamento 3, os animais receberam uma gota padrão a cada seis horas no olho afetado de ciprofloxacino 0,3% associado com sulfato de condroitina 20%; (doses recomendadas pelos fabricantes),(anexo I, página 59).

**Determinação da dose (Doseamento posológico do colírio e pomada oftálmica):**

Para determinarmos as doses do colírio e pomada oftálmica a serem ministradas, realizou-se no pré-experimento um procedimento padrão no qual se instilou uma gota padrão do colírio no saco conjuntival e um centímetro de pomada oftálmica na pálpebra inferior dos animais, respectivamente para os dois tratamentos

<sup>13</sup> Dermofórmulas farmácia de manipulação®, Curitiba, PR

<sup>14</sup> Embrarad Ltda®, São Paulo, SP.

<sup>15</sup> AKL oftálmica Ltda, São Paulo, SP

avaliados, em uma amostra experimental de quatro coelhas para cada forma farmacêutica, e após intervalos de seis, doze e vinte e quatro horas, realizaram-se os testes de embebição com tiras de Schirmer<sup>15</sup>, para a verificação quantitativa e qualitativa de colírio e pomada oftálmica no saco conjuntival e anexos palpebrais, resultando assim, nos quatro animais avaliados com a instilação do colírio, uma significativa presença do mesmo após doze horas da primeira instilação, (sinais de veículo oleoso em 90% da extensão das tiras utilizadas), sugerindo que o veículo oleoso ainda se mostrava presente no local após o período citado. No caso da pomada oftálmica, percebeu-se visualmente e confirmou-se com a embebição das tiras de Schirmer nos quatro animais avaliados a presença de veículo oleoso após dezoito horas da primeira aplicação e nos dois casos, por razões de margem de segurança, padronizou-se uma instilação a cada doze horas, para o tratamento no transcorrer do experimento, levando em consideração os trabalhos de (GELLAT e SAMUELSON., 1982), nos quais se determinou uma frequência mínima de doze horas entre as instilações de colírios e pomadas oftálmicas no tratamento de úlceras corneanas em cães, (anexo I, página 59).

#### **Etapas do desenvolvimento farmacotécnico:**

O desenvolvimento do colírio e da pomada oftálmica seguiu as etapas padrão citadas por (NOGUEIRA., 1988), sendo avaliados por controle de qualidade em todas as etapas do processo, o produto final desejado apresentou obrigatoriamente as seguintes características:

##### **Colírio:**

- Precisão de composição.
- Apresentação leitosa decorrente da diluição do ciprofloxacino 0,3%.
- Isotonicidade adequada.
- pH compatível com o do líquido lacrimal.
- Esterilidade.
- Ausência de pirógenos.

##### **Pomada:**

- Precisão na composição.
- Apresentação cremosa com viscosidade de unguento oftálmico.
- Otonicidade adequada.
- pH compatível com o do líquido lacrimal.

- Esterilidade.
- Ausência de pirógenos.

**Veículo:**

No caso do colírio, o veículo da preparação oftalmológica escolhido é o óleo de girassol puro; contudo, por razões farmacotécnicas relacionadas com a instabilidade da suspensão, cogitou-se o uso de adjuvantes, tais como o propilenoglicol e a água bidestilada, por suas inúmeras vantagens como a sua inércia frente a compostos ácidos e termolábeis (NORGADO., 1996). No entanto os adjuvantes foram descartados nas primeiras avaliações do veículo, pois não produziram acréscimo algum à estabilidade da suspensão, além de diminuir a viscosidade, e oleosidade desejáveis nesta forma farmacêutica. Optamos assim pelo uso do óleo puro seguindo o padrão de diluição segundo (NOGUEIRA., 1988). No caso da pomada oftálmica o veículo base foi desenvolvido com uma associação de lanolina/ vaselina e óleo de girassol, na proporção de 1 para 2, resultando em uma pomada bastante viscosa, semelhante a um unguento oftálmico, sendo que a dissolução do ciprofloxacino ocorreu com grande facilidade e fácil homogeneização (NOGUEIRA., 1988).

**Testes de solubilidade:**

No caso do colírio, os testes de solubilidade foram iniciados tendo como solvente o óleo de girassol. O teste se realizou da forma tradicional, avaliando a solubilidade de acordo com a seqüência desenvolvida por (NORGADO., 1996). Após os testes iniciais, demonstrou-se que o ciprofloxacino era perfeitamente solúvel em óleo de girassol, atingindo estabilidade relativa grau três, portanto, dentro dos padrões aceitáveis para fármacos oftalmológicos solúveis em veículos oleosos, (KIM E KOUVAS, 1990). Porém a decantação do precipitado iniciava-se três minutos após a agitação do produto para instilação, alertando sobre a necessidade de adição de um estabilizante. No caso da pomada oftálmica os testes de solubilidade seguiram o mesmo protocolo e sinalizaram uma perfeita solubilidade entre o ciprofloxacino e o veículo desenvolvido. Assim sendo verificou-se a melhor estabilidade da pomada em comparação ao colírio.

**Esterilidade e preservação:**

Todas as soluções oftálmicas devem ser estéreis e sempre que possível, devem conter conservantes adequados para garantir a esterilidade durante o tempo de uso. As soluções oftálmicas destinadas ao uso durante a cirurgia ou em olhos

traumatizados, geralmente não contêm conservantes porque eles são irritantes aos tecidos mais internos dos olhos.

O método de esterilização e preservação ideal foi evidenciado após a realização da seqüência padrão de testes de esterilidade, seguindo o protocolo de (PRISTA., 1991).

#### 4.1 MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTERILIZAÇÃO

Os frascos âmbar padrão e os tubos de alumínio destinados ao acondicionamento do colírio e pomada oftálmica respectivamente foram previamente autoclavados e envasados em embalagens plásticas estéreis após o envase, procedimento este, realizado em laboratório padrão para manipulação de sólidos e líquidos em farmácia magistral.<sup>16</sup> Na seqüência, lacram-se individualmente os frascos âmbar padrão e lacram-se os tubos de alumínio e remeteu-se, via sedex, o material para o laboratório especializado na esterilização de material biológico através de bombardeio por raios gama <sup>17</sup>, método ideal pelo baixo custo, alta eficácia contra esporos, bactérias e demais agentes infectantes.

##### **Conservantes avaliados:**

A conservação de uma preparação oftálmica requer cuidados de armazenagem, substâncias autoconservativas internas e um manejo adequado entre as janelas de instilação. Assim durante o desenvolvimento do colírio e da pomada foram testados os seguintes componentes para uma melhor conservação:

- Cloreto de benzalcônio a 0,13% (é um dos mais confiáveis, o problema é sua incompatibilidade com fármacos aniônicos, característica do ciprofloxacino, descartando assim, o seu uso).
- Cloreto de benzetônio a 0,01%.
- Clorobutanol a 0,5% (é hidrolisado e decomposto em autoclave ou sob calor moderado sendo, por isso, já descartado).
- Acetato de fenilmercúrio a 0,004%.
- Nitrito de fenilmercúrio a 0,004%.
- Timerosol a 0,01%.

<sup>16</sup>Dermofórmulas farmácia de manipulação®, Curitiba, PR.

<sup>17</sup>Embrarad Ltda®, São Paulo, SP.

Nas concentrações recomendadas todos os conservantes citados são ineficazes contra *Pseudomonas aeruginosa* (PRISTA., 1991), sendo esta bactéria colagenolítica o maior problema em conservação de colírios e pomadas cicatrizantes de úlceras corneanas, Verificou-se assim que uma mistura de conservante, composta por cloreto de benzalcônio 0,01% e 1000 unidades USP de sulfato de polimixina B por ml de solução é eficaz para maioria das cepas de *Pseudomonas*, não sendo irritante para o olho. Em algumas preparações oftálmicas, emprega-se uma mistura de cloreto de benzalcônio (0,01%) e etilenodiamino-tetra – acetato dissódico, de 0,01% a 0,1% com a mesma finalidade. Este último agente é quelante para metais, tendo a capacidade de tornar as cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* mais sensíveis ao cloreto de benzalcônio. Como a polimixina B poderia interferir com o resultado das avaliações (ação antibiótica), optou-se por não adicionar conservantes ao colírio e pomada oftálmica, levando em consideração que o ciprofloxacino e suas ações *in vitro* proporcionam um efeito de conservação eficaz, em períodos agudos de uso (PRISTA., 1991). Contudo se o armazenamento do colírio e pomada oftálmica for por um período maior que três meses, necessita-se de novos estudos para se desenvolver um conservante eficaz contra fungos e leveduras.

#### **Isotonicidade:**

A isotonicidade é uma característica fundamental para preparações oftalmológicas, assim se uma suspensão ou solução for administrada através de uma membrana que é permeável, como a da córnea, as moléculas do solvente e não as moléculas do soluto (membrana semipermeável) poderão induzir ao surgimento de um fenômeno denominado osmose reversa, ou seja, as moléculas do solvente atravessam a membrana de modo reverso. O que se procura evitar com a isotonização do colírio e da pomada oftálmica é que esse processo ocorra sobre a córnea e anexos oculares, pois os mesmos funcionam como membranas semipermeáveis altamente sensíveis a alterações osmóticas locais. Sem esta característica o colírio e a pomada oftálmica desidratariam a córnea. Contudo, os óleos em geral não carecem de grandes alterações em sua isotonicidade natural, requerendo uma adequação bastante discreta ao padrão ideal de isotonicidade, (NOGUEIRA., 1988).

**Método de isotonização:**

Método baseado no equivalente grama de NaCl a 0,9%, tendo este como agente isotonzante, lembrando que a concentração de NaCl a 0,9% equivale a pressão osmótica do sangue e da água. Assim a isotonicidade foi facilmente ajustada e atingida ao aditivarmos 0,05% de NaCl para cada frasco de colírio e tubo de pomada oftálmica.

**Tamponamento:**

Os tampões podem ser utilizados em uma solução oftálmica por um ou todos os motivos seguintes:

- Reduzir o desconforto do paciente;
- Garantir a estabilidade do fármaco
- Controlar a atividade terapêutica do medicamento

As lágrimas têm um pH de aproximadamente 7,4; óleo de girassol tem um pH entre 6 e 6,5, o que praticamente descarta a necessidade de uso de um tampão já que a própria lágrima é uma solução tampão capaz de suportar o provável pH final do colírio e da pomada oftálmica que deverão ficar entre 5,0 e 6,0 (HILSON., 1991).

**Viscosidade e agentes espessantes:**

Este item é muito importante no desenvolvimento de um colírio, pois o tempo de contato do colírio com o olho normalmente é muito pequeno, podendo ser aumentado com o aumento da viscosidade, (HILSON., 1991). Esse aumento do tempo de contato é importantíssimo, pois automaticamente aumenta a biodisponibilidade e o tempo de ação do medicamento. Os veículos oleosos são ideais no caso de viscosidade, pois normalmente não necessitam ter a sua viscosidade alterada por nenhum agente espessante; já os veículos aquosos devem ter sempre a eles associados um agente espessante sendo normalmente este agente a metilcelulose. Assim, não houve necessidade de adicionarmos agentes espessantes ou alteradores da viscosidade após os resultados obtidos pela embebição das tiras de Schirmer na sequência da instilação teste do colírio indicando presença do colírio no saco conjuntival e anexos, vinte e quatro horas após a instilação de uma gota padrão no olho esquerdo dos animais. No caso da pomada oftálmica a base lanolina/vaselina e óleo de girassol (1 para 2), produziu um veículo altamente viscoso, descartando a necessidade de aditivação de agentes espessantes (HILSON., 1991).

**Biodisponibilidade:**

A biodisponibilidade dos colírios e pomadas oftálmicas estão ligados diretamente a capacidade que os fármacos possuem de se ligar as proteínas da lágrima. Quanto maior essa ligação, menor será a quantidade de fármaco que terá uma boa absorção ocular (COLAGERO., 1994). Cabe lembrar que na maioria das doenças, incluindo o glaucoma, a quantidade de proteínas presentes na lágrima está aumentada, o que diminui a absorção do fármaco. Pode o fármaco também sofrer degradação pelas lizozimas presente na lágrima, diminuindo mais ainda a quantidade de fármaco absorvida (KADDOURA e WILSON., 1996). Assim, este quesito é importante apenas para o ciprofloxacino, pois o veículo restringe suas ações apenas a efeitos locais. Não se realizou teste de biodisponibilidade in vivo, pois o custo é extremamente proibitivo. Mas os resultados terapêuticos obtidos associados a grande reminiscência dos veículos no local de instilação nos sugerem alta biodisponibilidade, levando em consideração testes realizados com outros óleos e pomadas oftálmicas realizados por (KADDOURA e WILSON., 1996).

**Acondicionamento:**

O acondicionamento foi realizado, no caso do colírio, em frascos de 30ml de vidro âmbar com conta gotas padrão unido a tampa lacrada. No caso da pomada oftálmica o acondicionamento foi realizado em tubo de alumínio padrão lacrado.

## 5 RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TRATAMENTOS

Em concordância aos objetivos gerais e específicos delineados para este experimento obtivemos os seguintes resultados:

### 5.1 DESENVOLVIMENTO FARMACOLÓGICO

**Colírio formulado com óleo de girassol associado ao ciprofloxacino 0,3%:** O desenvolvimento do colírio obedeceu a todas as etapas farmacotécnicas obrigatórias, sob aspectos de segurança toxicológica, esterilidade, padronização de doseamento, e sofreu avaliações de controle de qualidade seguindo o protocolo de (NOGUEIRA., 1988), demonstrando ser um colírio com aparência leitosa, odor suave e pH próximo ao neutro, ótima acomodação e aceitação pelo paciente, sem demonstrar em nenhum dos animais avaliados sinais de irritação, conjuntivite, prurido, ardência, toxicidade local e ou sistêmica, com aplicação facilitada devido ao veículo oleoso e altamente aderente à córnea e seus anexos, ótima tolerabilidade em todas as fases do tratamento, mesmo no pós-operatório não induzia sinais de desconforto, dor e ou ardência na instilação. Contudo demonstrou uma excessiva instabilidade *in vitro*, necessitando de agitação vigorosa e freqüente para a manutenção da homogeneidade da suspensão oftálmica estéril. Conclui-se por conseguinte, que o colírio demonstrou resultados satisfatórios sob o ponto de vista toxicológico e terapêutico; não apresentou interações medicamentosas entre os componentes da fórmula *in vitro* e *in vivo*, apresentando eficácia terapêutica e eficácia sob aspectos de bioequivalência e biodisponibilidade oftálmicos, mas foi insatisfatório sob o ponto de vista farmacotécnico, devido a instabilidade da suspensão, indicando a necessidade de alteração na formulação para que se cogite a exploração industrial do produto, restringindo seu uso para o âmbito experimental e ou hospitalar.

**Pomada oftálmica formulada com base de lanolina/vaselina e óleo de girassol (1/2) associado ao ciprofloxacino 0,3%:** O desenvolvimento da pomada oftálmica obedeceu a todas as etapas farmacotécnicas obrigatórias, sob aspectos de segurança toxicológica, esterilidade, padronização de doseamento e sofreu avaliações de controle de qualidade seguindo o protocolo de (NOGUEIRA., 1988),

demonstrando ser uma pomada oftálmica com aparência cremosa, coloração amarelada, odor característico da lanolina e pH próximo ao neutro, a acomodação foi a mesma de outras preparações oftálmicas em pomada, produzindo provável embaçamento da visão por até trinta minutos após a aplicação. A aceitação e acomodação visual aparente demonstrada pelos animais foram similares aos resultados obtidos por (PEIFFER *et al*, 1977), no sentido que todos os animais demonstravam um relativo desconforto à aplicação, fato já esperado na aplicação de pomadas oftálmicas, (PEIFFER *et al*, 1977), desconforto este que persistia por até trinta minutos após a aplicação, contudo sem demonstrar em nenhum dos animais avaliados sinais de irritação, conjuntivite, prurido, ardência, toxicidade local e ou sistêmica, com aplicação facilitada devido ao veículo cremoso e altamente aderente à córnea e seus anexos, ótima tolerabilidade em todas as fases do tratamento; mesmo no pós-operatório não induzia sinais de desconforto, dor e ou ardência na instilação. Conclui-se por conseguinte, que a pomada oftálmica demonstrou resultados satisfatórios sob o ponto de vista toxicológico e terapêutico, não apresentando interações medicamentosas entre os componentes da fórmula *in vitro* e *in vivo*, demonstrando ser eficaz terapeuticamente e sob aspectos de bioequivalência e biodisponibilidade oftálmicos, além de resultados satisfatórios sob o ponto de vista farmacotécnico, devido à ótima estabilidade do veículo, indicando uma preparação oftálmica estável e perfeitamente solúvel entre seus componentes.

## 5.2 RESULTADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DOS QUATRO TRATAMENTOS AVALIADOS.

### 5.2.1 Grupo 1- Tratamento controle, com ciprofloxacino 0,3% isolado (Ciloxan®).

Foram observados neste grupo, durante o período avaliado, sinais de neovascularização, presença de secreções moderadas. Sinais de quemose, edema de córnea, presença de pigmentos, Tyndall positivo e alterações em tecido linfóide, foram verificados com graus moderados a severos até o sétimo dia de avaliação quando tenderam a desaparecer ou tornarem-se discretos. Contudo o blefaroespasmos e hiperemia conjuntival estavam presentes durante os quatro primeiros dias em grau acentuado, evoluindo para grau leve a moderado a partir do

quinto dia até o sétimo dia de avaliação. O teste de fluoresceína positivo foi observado até o quinto dia, em média, neste grupo de animais. Ocorreu também uma opacidade local restrita a área ceratectomizada, que permaneceu por todo o tratamento, sendo mais discreta após o décimo quarto dia de avaliação. Este grupo demorou claramente mais tempo para a cicatrização das úlceras produzidas do que os outros dois grupos, sinalizando a importância do veículo adequado na cicatrização de ulcerações corneanas.

Nos cortes histológicos, observamos no sétimo dia que na camada epitelial apresentavam-se grande quantidade de células jovens, edema e células descamadas e áreas de abrasão. Pode-se observar também intensa desorganização lamelar e edema estromal intenso, assim como intensa proliferação de fibrócitos e fibrilas de colágeno. Nos cortes do décimo quarto dia, observaram-se alterações semelhantes ao do grupo anterior (sete dias), contudo com intensidade menor nas áreas de descamação e desorganização lamelar, mas muito mais intensa em comparação aos outros dois tratamentos avaliados. Os cortes realizados com 21 e 42 dias praticamente já demonstravam uma estrutura celular reorganizada e cicatrizada não havendo diferença significativa entre os cortes histológicos destes dois grupos avaliados. No entanto foi observado ainda aos 42 dias a presença de células jovens e discreto edema intersticial, com organização de fibrilas de colágeno e fibrócitos bem estabelecida.

Como o teste de fluoresceína foi o parâmetro principal da avaliação podemos verificar que o colírio formulado com ciprofloxacino isoladamente (controle) demorou 30% a mais de tempo para cicatrizar a ulceração que os outros dois grupos tratados.

#### 5.2.2 Grupo 2 - Tratamento com ciprofloxacino 0,3% associado ao sulfato de condroitina 20% (Ciprovet®).

Foram observados neste grupo, durante o período avaliado, sinais de neovascularização (Pannus) e presença de secreções, além de Tyndall positivo e presença de pigmentos. Porém sinais de quemose, edema de córnea e alterações em tecido linfóide, foram verificados com graus moderados até o sexto dia de avaliação quando tenderam a desaparecer ou tornarem-se discretos. Contudo o blefaroespasma e hiperemia conjuntival estavam presentes durante os três primeiros

dias em grau acentuado, evoluindo para grau leve a moderado a partir do quarto dia até o sétimo dia de avaliação. O teste de fluoresceína positivo foi observado até o quarto dia, em média neste grupo de animais. Ocorreu também uma opacidade local restrita a área ceratectomizada que permaneceu por todo o tratamento, sendo mais discreta após o décimo quarto dia de avaliação. Este grupo demorou claramente menos tempo para a cicatrização das úlceras produzidas do que o grupo ciprofloxacino isolado (controle) e discretamente mais tempo para a cicatrização da úlcera em comparação ao grupo ciprofloxacino + girassol, observável apenas clinicamente, porém obtendo resultados similares nos testes estatísticos e histológicos, sinalizando a importância do veículo adequado na cicatrização de ulcerações corneanas.

Nos cortes histológicos, observamos no sétimo dia que na camada epitelial apresentavam-se moderada quantidade de células jovens, discreto edema e células descamadas. Porém intensas áreas de abrasão puderam ser observadas, também intensa desorganização lamelar e moderado edema estromal, assim como intensa proliferação de fibrócitos e fibrilas de colágeno. Nos cortes do décimo quarto dia, observaram-se alterações semelhantes ao do grupo anterior (sete dias), contudo com intensidade menor nas áreas de descamação e desorganização lamelar, mas, menos intensas em comparação ao grupo ciprofloxacino isolado (controle) e similar ao grupo ciprofloxacino + girassol. Os cortes realizados com 21 e 42 dias praticamente já demonstravam uma estrutura celular reorganizada e cicatrizada não havendo diferença significativa entre os cortes histológicos destes dois grupos avaliados. Entretanto foi observado ainda aos 42 dias, a presença discreta de células jovens e discreto edema intersticial, com organização de fibrilas de colágeno e fibrócitos bem estabelecida.

Como o teste de fluoresceína foi o parâmetro principal da avaliação podemos verificar que o colírio ciprofloxacino + condroitina cicatrizou 30% mais rapidamente suas úlceras em comparação ao grupo ciprofloxacino isolado (controle) e apresentou resultados estatísticos e histológicos similares ao grupo ciprofloxacino + girassol; porém clinicamente demonstrou ser discretamente mais lento na remissão dos sinais clínicos avaliados em comparação ao grupo em questão.

### 5.2.3 Grupo 3 - Tratamento com ciprofloxacino 0,3% associado ao óleo de girassol.

Foram observados neste grupo, também durante o período avaliado sinais de neovascularização (pannus) e presença de secreções, Tyndall positivo e presença de pigmentos. Porém sinais de quemose, edema de córnea e alterações em tecido linfóide, foram verificados com grau moderado a leve até o quinto dia de avaliação quando tenderam a desaparecer ou tornarem-se discretos. Contudo o blefaroespasmó e hiperemia conjuntival, assim como nos outros dois grupos, estavam presentes durante os três primeiros dias em grau acentuado, evoluindo para grau leve a moderado a partir do quarto dia até o sétimo dia de avaliação. O teste de fluoresceína positivo foi observado até o quarto dia, em média neste grupo de animais. Porém houve animais com o teste de fluoresceína negativo no terceiro dia de tratamento. Ocorreu também uma opacidade local restrita a área ceratectomizada, que permaneceu por todo o tratamento, sendo mais discreta após o décimo quarto dia de avaliação. Este grupo demorou claramente menos tempo para a cicatrização das úlceras produzidas do que o grupo ciprofloxacino isolado (controle) e discretamente menos tempo para a cicatrização da úlcera em comparação ao grupo ciprofloxacino + condroitina, observável apenas clinicamente, mas obtendo resultados similares nos testes estatísticos e histológicos, sinalizando a importância do veículo adequado na cicatrização de ulcerações corneanas.

Nos cortes histológicos, observamos no sétimo dia, da mesma forma que no grupo anterior, que na camada epitelial apresentavam-se moderada quantidade de células jovens, discreto edema e células descamadas. Porém, no caso deste grupo, menos intensas áreas de abrasão. Podemos observar também moderada desorganização lamelar e moderado edema estromal, assim como intensa proliferação de fibrócitos e fibrilas de colágeno. Nos cortes do décimo quarto dia, a exemplo dos grupos anteriores, observaram-se alterações semelhantes ao do grupo anterior (sete dias), contudo com intensidade menor nas áreas de descamação e desorganização lamelar, mas menos intensa em comparação ao grupo ciprofloxacino isolado e similar ao grupo ciprofloxacino + condroitina. Os cortes realizados com 21 e 42 dias, a exemplo dos grupos anteriores, praticamente já demonstravam uma estrutura celular reorganizada e cicatrizada, não havendo diferença significativa entre os cortes histológicos destes dois grupos avaliados. Novamente repetindo o observado nos outros grupos, foi visto ainda aos 42 dias a

presença discreta de células jovens e discreto edema intersticial, com organização de fibrilas de colágeno e fibrócitos bem estabelecida. O grupo ciprofloxacino + girassol apresentou aos 14 dias, nos cortes histológicos, uma estrutura celular mais organizada que os dois grupos anteriores, sinalizando uma maior capacidade de cicatrização e reorganização celular em detrimento aos outros grupos, com diferença mínima em relação ao grupo ciprofloxacino + condroitina e mais evidenciada com relação ao grupo ciprofloxacino isolado (controle).

Como o teste de fluoresceína foi o parâmetro principal da avaliação podemos verificar que o colírio ciprofloxacino + girassol cicatrizou 30% mais rapidamente suas úlceras em comparação ao grupo ciprofloxacino isolado (controle) e apresentou resultados estatísticos e histológicos similares ao grupo ciprofloxacino + condroitina, o qual, clinicamente demonstrou ser discretamente superior na remissão dos sinais clínicos avaliados em comparação ao grupo em questão.

#### 5.2.4 Grupo 4 - Tratamento com a pomada oftálmica, lanolina / vaselina e óleo de girassol (1/2) associada ao ciprofloxacino 0,3%.

Foram observados neste grupo resultados muito similares aos do grupo ciprofloxacino + girassol em colírio durante o período avaliado, com sinais de neovascularização (pannus) e presença de secreções, Tyndall positivo e presença de pigmentos. Porém sinais de quemose, edema de córnea e alterações em tecido linfóide, foram verificados com grau moderado a leve até o quinto dia de avaliação quando tenderam a desaparecer ou tornarem-se discretos. O blefaroespasmó e hiperemia conjuntival, assim como nos outros dois grupos estavam presentes durante os três primeiros dias em grau acentuado, evoluindo para grau leve a moderado a partir do quarto dia até o sétimo dia de avaliação, o teste de fluoresceína positivo foi observado até o quarto dia, em média neste grupo de animais. Porém houve animais com o teste de fluoresceína negativo no terceiro dia de tratamento, da mesma forma que o observado no grupo ciprofloxacino + girassol em colírio. Ocorreu também uma opacidade local restrita a área ceratectomizada, neste grupo em especial com menor incidência que nos anteriores, que permaneceu por todo o tratamento, sendo mais discreta após o décimo quarto dia de avaliação. Este grupo demorou claramente menos tempo para a cicatrização das úlceras

produzidas do que o grupo ciprofloxacino isolado (controle) e discretamente menos tempo para a cicatrização da úlcera em comparação ao grupo ciprofloxacino + condroitina, mas sem diferença alguma com relação ao grupo ciprofloxacino + óleo de girassol em colírio, observável apenas clinicamente, obtendo resultados similares nos testes estatísticos e histológicos, sinalizando assim como nos outros grupos, a importância do veículo adequado na cicatrização de ulcerações corneanas.

Nos cortes histológicos, observamos no sétimo dia, da mesma forma que nos grupos anteriores, que na camada epitelial apresentavam-se moderada quantidade de células jovens, discreto edema e células descamadas; porém, no caso deste grupo, menos intensas áreas de abrasão. Podemos observar também moderada desorganização lamelar e moderado edema estromal, assim como intensa proliferação de fibrócitos e fibrilas de colágeno, resultado similar ao obtido no grupo ciprofloxacino + óleo de girassol em colírio. Nos cortes do décimo quarto dia, a exemplo dos grupos anteriores, observaram-se alterações semelhantes ao do grupo anterior (sete dias), contudo com intensidade menor nas áreas de descamação e desorganização lamelar, mas menos intensa em comparação ao grupo ciprofloxacino isolado (controle) e similar ao grupo ciprofloxacino + condroitina e similar ao do grupo cipro+ girassol em colírio. Os cortes realizados com 21 e 42 dias, a exemplo dos grupos anteriores, praticamente já demonstravam uma estrutura celular reorganizada e cicatrizada não havendo diferença significativa entre os cortes histológicos destes dois grupos avaliados. Novamente repetindo o observado nos outros grupos, foi observado ainda aos 42 dias a presença discreta de células jovens e discreto edema intersticial, com organização de fibrilas de colágeno e fibrócitos bem estabelecida. O grupo ciprofloxacino + girassol em colírio apresentou aos 14 dias, nos cortes histológicos, uma estrutura celular mais organizada que os dois grupos anteriores, sinalizando uma maior capacidade de cicatrização e reorganização celular em detrimento aos outros grupos, com diferença mínima em relação ao grupo ciprofloxacino + condroitina e mais evidenciada com relação ao grupo ciprofloxacino isolado (controle), resultado similar obtido neste grupo ciprofloxacino + girassol em pomada oftálmica.

Como o teste de fluoresceína foi o parâmetro principal da avaliação podemos verificar que o grupo ciprofloxacino + girassol em pomada, assim como o grupo ciprofloxacino + girassol em colírio cicatrizou 30% mais rapidamente suas úlceras em comparação ao grupo ciprofloxacino isolado (controle) e apresentou resultados

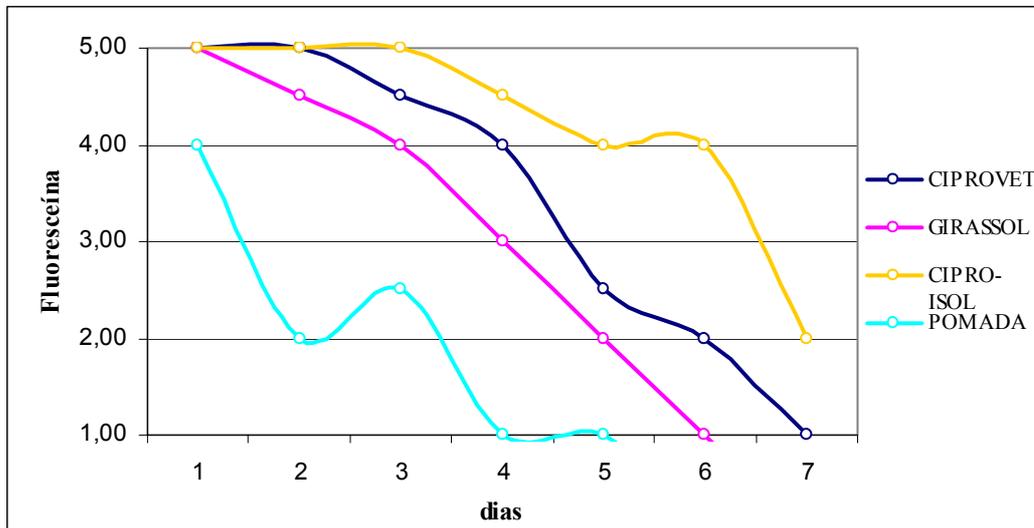
estatísticos e histológicos similares ao grupo ciprofloxacino + condroitina. Contudo clinicamente demonstrou ser discretamente superior na remissão dos sinais clínicos avaliados em comparação ao grupo em questão.

### 5.2.5 Grupo sete dias

**Tabela 1** – Evolução dos tratamentos com o parâmetro do teste de **Fluoresceína** em 7 dias de intervalo, sob o protocolo de (MUNGER, 2002).

Tratamento	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
CIPROVET	5	5	4	4	3	2	1
CIPROVET	5	5	5	5	4	3	1
CIPROVET	5	5	3	4	2	1	0
CIPROVET	5	5	5	3	2	2	1
Mediana	5,00	5,00	4,50	4,00	2,50	2,00	1,00
GIRASSOL	5	4	4	3	2	1	0
GIRASSOL	5	5	4	3	1	1	0
GIRASSOL	5	3	4	3	2	1	0
GIRASSOL	5	5	2	2	2	1	0
Mediana	5,00	4,50	4,00	3,00	2,00	1,00	0,00
CIPRO-ISOL	5	5	5	4	4	4	2
CIPRO-ISOL	5	5	4	4	4	4	2
CIPRO-ISOL	5	5	5	5	4	3	3
CIPRO-ISOL	5	5	5	5	5	4	2
Mediana	5,00	5,00	5,00	4,50	4,00	4,00	2,00
POMADA	4	2	3	1	1	0	0
POMADA	4	3	3	1	1	0	0
POMADA	4	2	1	1	1	0	0
POMADA	5	2	2	1	1	0	0
Mediana	4,00	2,00	2,50	1,00	1,00	0,00	0,00

**Gráfico 1** – Evolução mediana dos tratamentos para o parâmetro de avaliação clínica do teste de **Fluoresceína**, segundo o protocolo de (MUNGER, 2002) com sete dias de intervalo.



### Hipóteses testadas

**H<sub>0</sub>**: Não existe diferença significativa entre os tratamentos no teste de Fluoresceína, entre os grupos analisados.

**H<sub>1</sub>**: Existe diferença significativa entre os tratamentos no teste de Fluoresceína, entre os grupos analisados.

### Teste de Kruskal-Wallis

Como o objetivo é verificar se existe diferenças entre as amostras para os tratamentos: Ciprovet, Cipro-Girassol, Cipro-Isolado e Pomada oftálmica significam diferenças efetivas entre as populações, ou se representam apenas variações casuais, que podem ser esperadas entre amostras. O nível de mensuração apresentado na variável fluoresceína categoria ordinal, com k amostras independentes, portanto exigências mínimas satisfeitas para a utilização do Teste de Kruskal-Wallis, é a prova não-paramétrica mais robusta para k-amostras independentes. O programa utilizado para as análises foi o SPSS versão 18.0.

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

onde  $K$  = número de amostras

$n_j$  = número de casos na amostra  $j$

$N = \sum n_j$ , número de casos em todas as amostras combinadas

$R_j$  = soma de postos na amostra (coluna)  $j$

$\sum_{j=1}^k$  indica somatório sobre todas as  $K$  amostras (colunas)

**Tabela 2** – Resultados do Teste de Kruskal-Wallis – Grupo 7 dias.

Tratamentos	Média do Rank						
	1	2	3	4	5	6	7
CIPROVET	--	11,50	10,50	11,38	10,13	10,13	9,50
GIRASSOL	--	8,38	7,38	6,88	6,75	7,00	5,00
CIPRO-ISOL	--	11,50	12,75	13,25	14,13	14,38	14,50
POMADA	--	2,63	3,38	2,50	3,00	2,50	5,00
p-valor	--	0,01	0,03	0,01	0,01	0,003	0,004

De acordo com os resultados apresentados na análise, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, diferença significativa foi apresentada a partir do quinto dia.

Para verificar entre quais tratamentos foram detectadas as diferenças estatísticas significativas, seguiu-se para a um teste de comparações múltiplas, que complementa o teste de Kruskal-Wallis mostrando assim quais tratamentos diferem entre si.

Considerando amostras pequenas e o mesmo número de repetições, ou seja, os valores de  $n$  iguais, calcula-se para cada par de tratamentos a diferença.

Onde  $Q$  = valor específico fornecido por tabela  $Q$  de Student

$K$  = número de amostras

$N = \sum n_j$ , número de casos em todas as amostras combinadas

$$d.m.s = Q \sqrt{\frac{k(N+1)}{12}}$$

Obtido a diferença entre a média dos rank's dos tratamentos, compara-se com o valor de  $d.m.s.$ , considerando diferença maior que o valor de  $d.m.s.$ , sendo significativa.

**Tabela 3** – Teste de d.m.s. – Grupo 7 dias

Diferenças Médias de Rank's: <b>d.m.s=8,85</b>	Dias					
	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
CIPROVET - POMADA	8,87*	7,12	8,88*	7,13	7,63	4,50
CIPRO-ISOL – POMADA	8,87*	9,37*	9,37*	11,13*	11,88*	9,50*

\*Diferença significativa  $p < 0,05$

### Resultados

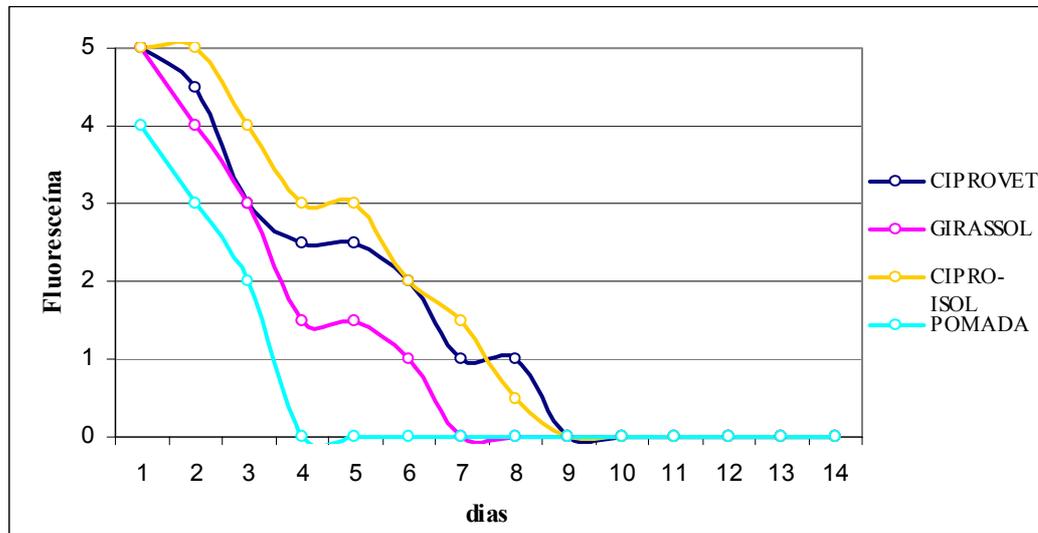
O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para o grupo 7 dias, detectou diferença significativa entre os tratamentos, no segundo ao sexto dia. Na seqüência foi aplicado o teste de comparações múltiplas de soma de rank's, para identificar que tratamentos apresentaram melhores resultados.

### Conclusão

A conclusão foi de que o tratamento pomada oftálmica e colírio de óleo de girassol apresentaram os melhores resultados, equivalentes estatisticamente, a partir do segundo ao sétimo dia. Salvo no terceiro, quinto, sexto e sétimo dias o colírio ciprovect é estatisticamente equivalente à pomada oftálmica e colírio de óleo de girassol. Os resultados menos satisfatórios são computados ao grupo ciprofloxacino isolado (controle).



**Gráfico 8** – Evolução mediana dos tratamentos, avaliados pelo teste da fluoresceína em 14 dias de tratamento, sob o protocolo de (MUNGER, 2002).



### Análise Estatística

**Tabela 5** – Resultados do Teste de Kruskal-Wallis – Grupo 14 dias

Tratamentos	Média do Rank							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CIPROVET	--	10,00	11,00	10,38	11,38	11,63	12,13	9,75
GIRASSOL	--	10,00	8,00	7,63	6,50	7,25	6,75	6,25
CIPRO-ISOL	--	10,00	12,50	13,13	12,50	12,63	12,13	13,50
POMADA	--	4,00	2,50	2,88	3,63	2,50	3,00	4,50
p-valor	--	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02

\*do 9º ao 14º os resultados estabilizaram em todos os tratamentos

De acordo com os resultados apresentados na análise, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, ocorreu diferença significativa apenas no sétimo dia.

**Tabela 6**– Teste de d.m.s. – Grupo 14 dias

Diferenças Médias de Rank's: d.m.s=8,85	Dias						
	2	3	4	5	6	7	8
CIPROVET - POMADA	6,00	8,50	7,50	7,75	9,13*	9,13*	5,25
CIPRO-ISOL - POMADA	6,00	10,00	10,25	8,87	10,13*	9,13*	9,00*

\*Diferença significativa  $p < 0,05$

## **Resultados**

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para o grupo 14 dias, detectou diferença significativa entre os tratamentos, no segundo ao oitavo dia. Na seqüência foi aplicado o teste de comparações múltiplas de soma de rank's, para identificar que tratamentos apresentaram melhores resultados.

## **Conclusão**

A conclusão foi de que o tratamento pomada oftálmica e colírio de óleo de girassol apresentaram os melhores resultados, equivalentes estatisticamente, a partir do terceiro ao oitavo dia. Salvo no terceiro, quarto, quinto e oitavo dias o tratamento ciprovet é estatisticamente equivalente ao tratamento pomada oftálmica e ao colírio de óleo de girassol. Os piores resultados são novamente computados ao colírio de ciprofloxacino isolado (controle).

### **5.2.7 Análise dos Grupos 21 e 42 dias:**

Estes dois últimos grupos demonstraram uma variação mínima de resultados, tendo em vista que todos os animais avaliados cicatrizaram suas úlceras com período igual ou inferior a 14 dias, assim sendo, mostrou-se desnecessária sob os quesitos avaliados no experimento, a tabulação dos referidos dados, assim como a sua análise pormenorizada.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 COLÍRIO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO

Os resultados obtidos após o desenvolvimento do colírio, foram positivos no sentido terapêutico e toxicológico, contudo não obtiveram êxito no quesito estabilidade do fármaco. Assim, o óleo de girassol como veículo para o ciprofloxacino, demonstrou ser inerte, no sentido que não alterou as características físico-químicas do fármaco tanto *in vivo* como *in vitro*, não havendo fenômenos de interação negativa entre os dois componentes. Da mesma forma, não se observou reações adversas, tais como irritabilidade local, desconforto à instilação, reações alérgicas, desidratação corneana, má absorção local ou quaisquer outras idiossincrasias passíveis de ocorrer em um tratamento experimental com fármacos da mesma forma experimentais, seguindo os parâmetros de controle de qualidade descritos por (NOGUEIRA., 1988). Em suma o colírio carece de aperfeiçoamento farmacotécnico para aumentar a sua estabilidade, para aumentar o tempo de solubilidade ideal entre os componentes da fórmula, viabilizando exploração comercial do composto. Aspectos farmacoeconômicos, tais como o custo dos tratamentos, depõe a favor a formulação magistral, no sentido de ser 27% mais barata em detrimento às outras duas medicações avaliadas. Outro ponto observado é que o colírio desenvolvido diminui a frequência posológica mínima para o tratamento das úlceras corneanas em detrimento aos outros dois tratamentos avaliados e suas respectivas posologias com quatro instilações diárias, sendo que o primeiro carece apenas de duas instilações diárias.

### 6.2 A POMADA OFTÁLMICA EXPERIMENTAL DESENVOLVIDA

Os resultados obtidos após o desenvolvimento da pomada oftálmica, foram positivos no sentido terapêutico e toxicológico, obtiveram da mesma forma, êxito no quesito estabilidade do fármaco. Assim, o óleo de girassol para a composição da pomada oftálmica associado ao ciprofloxacino, demonstrou ser um ótimo componente inerte para o fármaco, no sentido que não alterou as características físico-químicas do fármaco tanto *in vivo* como *in vitro*, não havendo fenômenos de

interação negativa entre os componentes. Da mesma forma, não se observou reações adversas, tais como irritabilidade local, reações alérgicas, desidratação corneana, má absorção local ou quaisquer outras idiossincrasias passíveis de ocorrer em um tratamento experimental com fármacos da mesma forma experimentais, seguindo os parâmetros de controle de qualidade descritos por (NOGUEIRA., 1988). Contudo, tratando-se de uma pomada oftálmica foi percebido um desconforto à aplicação que desaparecia após trinta minutos da instilação. Porém este tipo de forma farmacêutica classicamente induz desconforto à aplicação, tal como descreveu (PEIFFER et al., 1977), pois o veículo de base vaselínica tende a turvar a visão por alguns minutos até ser absorvido pela córnea e anexos palpebrais, (PEIFFER et al., 1977). Aspectos farmacoeconômicos, tais como o custo dos tratamentos, depõe a favor a formulação magistral também no caso da pomada, no sentido de ser 50 % mais barata em detrimento às outras duas medicações avaliadas. Outro ponto observado é que a pomada desenvolvida, a exemplo do colírio, diminui a frequência posológica mínima para o tratamento das úlceras corneanas em detrimento aos outros dois tratamentos avaliados e suas respectivas posologias com quatro instilações diárias, sendo que o primeiro carece apenas de duas instilações diárias. Em suma a pomada oftálmica tal como foi desenvolvida, possui todas as características de uma formulação merecedora de mais testes clínicos para qualificarem-na ao processo de produção em escala industrial, sendo estável, sem ações tóxicas locais e sistêmicas. No caso da produção em laboratório magistral de estéreis, a pomada qualifica-se como farmacotecnicamente viável.

### 6.3 COMPARAÇÃO CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA ENTRE OS QUATRO TRATAMENTOS DESENVOLVIDOS

Com relação aos efeitos antibióticos, observamos que não houve em nenhum dos grupos avaliados a sintomatologia de infecção bacteriana durante todo o período avaliado. Da mesma forma, o exame do tecido linfóide sinalizou uma reação inflamatória discreta em todos os grupos. Pannus oftálmico e avaliação da câmara posterior (Tyndall) surgiram discretamente em todos os grupos, mas restrita apenas aos primeiros dias. O aspecto cicatricial foi o quesito com maior diferenciação entre os tratamentos, sendo o grupo ciprofloxacino isolado (controle) aquele com os piores

resultados, demonstrando a ação fundamental de um veículo adequado para a abreviação no período de cicatrização da úlcera corneana. Estatisticamente não houve diferença de resultados entre os grupos ciprofloxacino + condroitina e ciprofloxacino + girassol tanto em colírio como em pomada oftálmica, assim como não houve diferença estatística sob os aspectos clínicos e histológicos, resultados que qualificam as formulações magistrais ao obterem resultados similares a um tratamento consagrado. No entanto, uma análise pormenorizada do resultado obtido indica uma abreviação de sintomatologia clínica mais eficaz no grupo ciprofloxacino + girassol tanto colírio como pomada oftálmica, principalmente na remissão de sintomas como quemose palpebral, edema corneano, e avaliação de tecido linfóide, provavelmente secundário aos efeitos antiinflamatórios dos ácidos graxos essenciais presentes no óleo de girassol (DECLAIR e CARMONA., 1994).

A reepitelização do grupo ciprofloxacino isolado (controle) corroborou os resultados obtidos por (RAWE., 1992), nos quais se observou cicatrização até o sétimo dia de avaliação, sinalizando que o ciprofloxacino isolado (controle), não altera o período de cicatrização. Contudo os grupos ciprofloxacino + condroitina e ciprofloxacino + girassol em colírio e pomada oftálmica, obtiveram resultados melhores em comparação aos resultados obtidos por (RAWE., 1992), e aos resultados do grupo ciprofloxacino isolado (controle), sugerindo efeito positivo dos aditivos presentes nas duas formulações. Os grupos ciprofloxacino + girassol em colírio e pomada oftálmica obtiveram resultados melhores que os obtidos por (SPENCER., 1985), nos quais a regeneração da córnea, sem qualquer tipo de tratamento, ocorreu em sete dias de avaliação. Assim pode-se afirmar que os tratamentos ciprofloxacino + girassol em colírio e pomada oftálmica abreviaram o período de cicatrização corneana em 72 horas, em comparação aos resultados obtidos sem quaisquer instilações medicamentosas. A opacidade local restrita apenas a área ceratectomizada foi observada também por (RAWE., 1992). Esta opacidade é secundária ao edema corneano associado a irregularidades das fibrilas de colágeno; todos os grupos apresentaram este sinal clínico, não havendo diferença entre os quatro tratamentos avaliados.

Histologicamente observa-se que os resultados do grupo ciprofloxacino isolado (controle) corroboram os resultados de (SPENCER et al., 1985) e (MARGOT., 1991), nos quais se observou nos cortes da camada epitelial uma grande quantidade de células jovens, edema, células descamadas e áreas de

abrasão aos sete dias de avaliação, sinais estes, também observados nos grupos ciprofloxacino + condroitina e ciprofloxacino + girassol em colírio e pomada oftálmica, contudo em menor intensidade. Os grupos ciprofloxacino + girassol em colírio e pomada oftálmica obtiveram os melhores resultados histológicos. Ao observarmos a lâmina destes grupos aos sete dias de avaliação podemos verificar uma melhor organização e clara regeneração da camada epitelial, com poucas células jovens ao contrário dos resultados de (SPENCER., 1985). Outro ponto de destaque no grupo ciprofloxacino isolado (controle) é a presença, tanto no meio intra como extracelular, de edema próximo à membrana basal, caracterizado pela coloração pálida do citoplasma celular e das áreas não preenchidas por epitélio, resultado similar ao obtido por de (SPENCER., 1985).

Este grupo também apresentou desorganização lamelar e edema estromal, associados à reduzida proliferação de fibrócitos e fibrilas de colágeno, ao contrário dos outros três grupos avaliados, assim como a discreta presença de neovascularização e de polimorfonucleares, indicando uma menor formação de tecido cicatricial, caracterizado pela presença de tecido conectivo com arranjo irregular, corroboram as informações de (SPENCER., 1985).

(RAWE, 1992) e (LANCE, 1998) relataram uma alta densidade de fibrócitos próximos à área lesada, principalmente após os primeiros sete dias da ceratectomia, como foi observado nos cortes histológicos do grupo ciprofloxacino isolado (controle), mas em menor proporção nos grupos restantes.

(LANCE, 1998) observaram a presença de neutrófilos no estroma anterior, próximo à área lesada, corroborando os resultados obtidos no grupo ciprofloxacino isolado (controle) e bem discretamente nos grupos restantes.

Estatisticamente não houve diferenças significativas entre os grupos ciprofloxacino + girassol em colírio e pomada oftálmica e o grupo ciprofloxacino + condroitina. Houve diferenças significativas entre estes três grupos e o grupo ciprofloxacino isolado (controle), no sentido que este último demonstra claramente sinais de reepitelização mais lenta, maior edema intra e extracelular maior desorganização lamelar e menor proliferação de fibrilas de colágeno e fibrócitos.

Quanto aos efeitos antibióticos, observa-se que não houve diferenças entre os quatro grupos avaliados sugerindo que este quesito obteve igual importância clínica sobre os quatro tratamentos e que os mesmos foram efetivos no controle das infecções secundárias.

Quanto aos resultados obtidos no desenvolvimento experimental de um colírio, observa-se novamente que foi obtido êxito no que tange a forma farmacêutica e todas as provas de controle de qualidade indicaram um produto adequado ao uso clínico em animais, com excelente aceitação por parte dos mesmos, de fácil instilação, não apresentando sinais de reação adversa de qualquer espécie ou toxicidade local e ou sistêmica, contudo, carecendo de aperfeiçoamento farmacotécnico no que concerne a estabilidade da suspensão, tendo em vista que poucas horas após a diluição já era perceptível no fundo do frasco um precipitado de difícil dissolução, necessitando de trinta minutos de agitação para atingir a homogeneidade da suspensão. No caso do desenvolvimento experimental de uma pomada oftálmica, observa-se que foi obtido êxito, da mesma forma, no que tange a forma farmacêutica e todas as provas de controle de qualidade indicaram um produto adequado ao uso clínico em animais, com um padrão de aceitação compatível aos resultados obtidos com outras pomadas oftálmicas, com fácil instilação, não apresentando sinais de reação adversa de qualquer espécie ou toxicidade local e ou sistêmica. Contudo neste caso não carecendo de aperfeiçoamento farmacotécnico no que concerne a estabilidade do veículo, tendo em vista que este veículo mostrou-se extremamente estável e homogêneo durante todo o período de tratamento. O ponto de dificuldade na produção da pomada oftálmica, a exemplo do ocorrido com o colírio, é o processo de esterilização muito dificultado, tendo em vista a necessidade de envio do material para São Paulo a fim de se obter uma esterilização adequada e eficaz, desqualificando este produto para uso em casos de emergência. Outro ponto a destacar seria referente ao custo do tratamento, sendo a pomada oftálmica desenvolvida 50% mais barata em comparação aos outros dois tratamentos industriais avaliados.

Quanto aos resultados clínicos e histológicos pode-se concluir que os grupos ciprofloxacino + condroitina e ciprofloxacino + girassol em colírio e pomada oftálmica foram claramente superiores aos resultados obtidos pelo grupo ciprofloxacino isolado (controle), indicando que o veículo e/ou os aditivos farmacológicos presentes nestes grupos, respectivamente o sulfato de condroitina A e os ácidos graxos essenciais, são fatores fundamentais na abreviação do período de cicatrização das úlceras corneanas nos coelhos avaliados corroborando os resultados de (WOUK., 1997) e (YOVICH., 1987), observado em eqüinos e (DECLAIR e CARMONA., 1994), na reepitelização epidérmica. Clinicamente concluiu-se que os grupos ciprofloxacino

+ girassol em colírio e pomada oftálmica debelaram com menos tempo toda a sintomatologia da ulceração corneana, em detrimento aos dois grupos restantes. Porém estatisticamente, esta diferença não se evidenciou com relação ao grupo ciprofloxacino + condroítina, com resultados similares aos de (BUCCI., 1994).

Histologicamente observa-se nos cortes realizados, um panorama reparativo melhor nos grupos ciprofloxacino + girassol em colírio e pomada oftálmica em detrimento aos outros dois grupos, com diferenças mais acentuadas em relação ao grupo ciprofloxacino isolado (controle), sendo que o grupo ciprofloxacino + condroítina não diferiu estatisticamente com relação aos grupos ciprofloxacino + girassol.

Sob o ponto de vista farmacoeconômico, conclui-se que o produto desenvolvido está apto a seguir as etapas padrão para a validação terapêutica de um ativo farmacológico, seguindo o protocolo de testes padrão, segundo a RDC 33 da ANVISA\*, podendo ser, a partir dos resultados obtidos, formulado em laboratório magistral de estéreis.

\* Resolução da agência nacional de vigilância sanitária que normatiza as etapas para validação, autorização e fabricação de medicamentos industriais.

## 7 CONCLUSÃO

Conclui-se desta maneira, que o colírio e a pomada oftálmica formulados com ciprofloxacino associado ao óleo de girassol apresentaram resultados superiores aos do grupo ciprofloxacino isolado (controle); e estatisticamente equivalentes aos do grupo ciprofloxacino associado ao sulfato de condroitina A, no que concerne ao tempo de cicatrização e remissão da sintomatologia clínica das ulcerações corneanas iatrogenicamente produzidas em coelhos. Conclui-se, da mesma forma, que os tratamentos desenvolvidos obtiveram resultados superiores aos dos grupos ciprofloxacino isolado e ciprofloxacino associado ao sulfato de condroitina A, no quesito diminuição da frequência posológica, reduzindo em 50% a frequência de instilação. Considera-se, da mesma maneira, aprovadas as formulações desenvolvidas sob aspectos de toxicidade e tolerabilidade ocular em coelhos. Portanto considera-se as formulações desenvolvidas aptas ao prosseguimento dos testes de validação seguindo o protocolo da ANVISA, no que concerne a sua autorização de fabricação e futura industrialização do produto, e finalmente conclui-se que as formulações desenvolvidas são vantajosas sob aspectos farmacoeconômicos com relação aos dois tratamentos comparados (ciprovect® e ciloxan®), pois seu custo total de tratamento foi significativamente menor do que seus similares citados.

## REFERÊNCIAS

- BELLHORN, R. W. & HENKIND, P. **Ocular nodular fasciitis in a dog.** JAVMA 150: 212, 1967.
- BUCCI L.R. **Chondroprotection with chondroitin sulfates.** Townsend letter for Doctors 1994; p.52-4.
- BURR, H.; BURR, M. **AGES in epitelial homeostasis.** American Society of Dermatology, 1979.
- COLAGERO G. **New paradigms in compounds practice.** American journal of compounds. 1994: 46(9):378-7.
- CORK, L. C., MUNELL, J. R. & LORENZ, M. D. **The pathology of feline GM2 gangliosidosis.** Am. J. Pathol. 90: 723, 1978.
- CRISPIN, S. M. & BARNETT, K. C. **Dystrophy, degeneration and infiltration of the canine cornea.** J. Small Anim. Pract. 24: 63, 1983.
- DECLAIR, V; CARMONA, M. **Ácidos graxos essenciais: protetores celulares dos mecanismos agressivos da lesão hipóxica.** São Paulo: Dermatologica Atual, 1994.
- GAUGHAN E.M. **Managing tendinitis in horses.** Vet Med 1994; 89(8): 789-94.
- GELATT, K. N. & SAMUELSON, D. A. **Recurrente corneal erosions and epithelial dystrophy in the boxer dog.** JAAHA 18: 453, 1982.
- GILGER, B. C., WHITLEY, R. D., MCLAUGHLIN, S. A. **Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry.** Am. J. Vet. Res. 52: 1570, 1991.
- GWIN, R. M., POLACK, F. M., WARREN, J. K., SAMUELSON, D. A. & GELATT, K. N. **Primary canine corneal endothelial cell dystrophy: specular microscopic evaluation, diagnosis and therapy.** JAAHA 18: 471, 1983.
- HILSON T.F., GILMANN H.U., **A review about protocols of compounds practice** American journal of compounds, 1991: 32(3):678-2.
- HOFFMAN, F. & SCHWEICHEL, J. U. **The microvilli structure of the corneal epithelium of the rabbit in relation to cell function: A transmission and scanning electron microscopic study.** Ophthalmic Res. 4: 175, 1972/1972.
- JEZYK, P. F. **Mucopolysaccharidosis in a cat with arylsulfatase B deficiency: A model of maroteaux-Lamy syndrome.** Science. 198: 834, 1977.
- KADDOURA R.D., WILSON N. **The stabilish of suspensions.** American journal of compounds, 1996: 102(5): 712-4.

KIM G.T., KOUVAS H. **New protocols in farmacotecnic.** American journal of Compounds. 67: 1460, 1990.

KOCH, S. A., LANGLOSS, J. M. & SCHIMIDT, G. M. **Corneal epithelial inclusion cysts in four dogs.** JAAHA 164: 1190, 1974.

LANCE S.E. **Diamond burring and surgical keratectomy.** Morphologic comparison in the rabbit. Arch Ophthalmol 1998; 106(6): 830-4.

MARGOT C.E., GROSSNIKLAUS H.E. **Ocular histopathology: a guide to differential diagnosis.** Philadelphia: Saunders; 1991.

MARTÍN, C. L. **Canine epibulbar melanomas and their management.** JAAHA 17: 83-90, 1981.

MILLER W.W. **Using polysulfated glycosaminoglycan to treat persistent corneal erosions in dogs.** Vet Med 1996; 91(10): 916-22.

MUNGER R.J. **Veterinary ophthalmology in laboratory animal studies.** Vet Ophthalmol 2002; 5(2): 167-75.

NOGUEIRA R.F. **Basic protocols in ophthalmic farmacotecnic.** Pharmacia Brasileira, 1988; 2 (supl) 31.

NORGADO I. **New vehicles in ophthalmology.** Pharmacia Brasileira 1996; 3 (supl) 28.

PARRY D.A.D., CRAIG A.S. **Growth and development of collagen fibrils in connective tissue.** In: Ruggeric A, Motta PM (eds). Ultra structure of the connective tissue matrix. The Haghe, Martinus Nihoff; 1984. p. 34-64.

PAULSEN, M. E. **Feline Eosinophilic keratitis: A review of 15 clinical cases.** JAAHA 23: 63, 1987.

PEIFFER, R. L., GELATT, K. N. & GWIN, R. M. **Tarsoconjuntival pedicle grafts for deep corneal ulceration in the dog an cat.** JAAHA 13: 387, 1977.

PRESS. J. **Serum lipidic alterations by the use of sunflower oil on topical applications.** ARCH, 1975.

PRISTA E. **American journal of compounds,** 1991: 35(6): 567-1.

RASK, L., GEIJER, C., BILL, A. & PETERSON, P. A. **Vitamin A supply of the cornea.** Exp. Eye Res. 31: 201, 1980.

RAWE I.M. **Proteoglycan an collagen morphology in superficially scarred rabbit cornea.** Histochem J 1992; 24(6): 311-8.

SHEPERD, H. ; LINN, K.L. **AGE aplications on epitelial lesion.** New York: American Journal of Dermatology, 1986.

SINCLAIR, G.L. ; SINCLAIR, J. **AGE uses in espezific dermatoses**. New York: Macmillan, 1989.

SLATTER, D. H., LAVACH, J. D., SEVERIN, G. A. & YOUNG, S. **Uberreiter's syndrome** (chronic superficial keratitis) in dogs in Rocky Mountain area. J. Small Anim. Pract. 18: 757, 1977.

SPENCER W.H. **Ophthalmic pathology**. Philadelphia: Saunders; 1985. v.1.

ÜBERREITER, O. **Eine besondere Keratitisform**: Keratitis superficialis chronica beim Hunde. Wien Tierärztl. Monatschr. 48: 65, 1961.

WALDE, I. **Bandopacities**. **Equine Vet. J. Suppl.** 2: 32, 1983.

WARING, G. O., MACMILLAN, A. & REVELES, P. **Inheritance of crystalline corneal dystrophy in Siberian Huskies**. JAAHA 22: 655, 1986.

WOUK A.F.P.F. **Polysulfated glycosaminoglycan used for the treatment of indolent corneal ulcers in horses**. Arch Vet Sci 1997; 2(supl): 36.

VAN DORP, J. **Reparation of dermatoses by AGE actions**. Glasgow: American Journal of Dermatology, 1990.

VERWER, M. A. J. **Partial mummification of the cornea in cats**: The corneal sequestrum. Proc. Am. Anim. Hosp. Assoc.: 112, 1965.

YOVICH J.V.W., MCLLWRAITH CW. **Pharmacologic properties of polysulfated glycosaminoglycan (Adequan®) an its application to treatment of equine degenerative joint disease**. In: 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Association of Equine Practioners; 1987; New Orleans. Proceedings. Los Angeles; 1987. P.707-13.

**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

- ALVES A.L.G. **A vez do glicosaminoglicano**. São Paulo: Saúde equina, 1998, p.13.
- BAILEY, H. **Advances in vegetables oils**. New York: Macmillan, 1981.
- BANKS W.J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1991. 629p.
- BERNARDES M, CORRALES C. **Novedad terapêutica em queratitis seca y ulceras de córnea**. Madrid: Facultad de Ciências Veterinárias – UNCSA; 1998.
- BISTNER, S. I., AGUIRRE, G. D. & SHIVELY, J. N. **Hereditary corneal dystrophy in the manx cat: A preliminary report Invest Ophthalmol. Vis. Sci.** 15: 15, 1976.
- CARMICHAEL, L. E., MEDIC, B. L. S., BISTNER, S. I. & AGUIRRE, G. D. **Viral antibody complexes in canine adenovirus type 1 (CAV-1) ocular lesions: leukocyte chemotaxis an enzyme release**. Cornell Vet. 65: 331, 1975.
- DIAZ V.B. **Chondroitin sulfate (Overview)**. In: Polymeric materials encyclopedia. (s.l.): Joseph C. Salamone/CRC Press; 1996. v.2.c.
- ECKEY, E.W. **Vegetable fats oils**. New York: Reinold, 1974.
- GELATT, K. N. **Herniation of orbital fat in a colt**. Vet. Med. 65: 146, 1970.
- LAUS J.L. **Condições corneas e queratoplastias**. In: 23º Congresso da Associação Mundial de Medicina Veterinária de Pequenos Animais. Ophthalmology Presentations. Buenos Aires; 1998.
- LAVIGNETTE, A. M. **Lamellar keratoplasty in the dog**. Sm. Anim. Clin. 2: 183, 1962.
- NAKAZAWA K, et al. **Modification of proteoglycan synthesis by corneal stromal cells on co-culture with either epithelial or endothelial cells**. J Biochemist 1997; 122(4): 851-8.
- NASISSE M.P. Canine ulcerative keratitis. In: \_\_. **Ophthalmology in small animal practice**. New Jersey: Veterinary Learning Systems; 1996.
- PAROLI, E. **Pharmacological approach to glycosaminoglycans**. Drug Exp Clin Res 1991; 17(1): 9-19.
- PIPITONE, V. R. **Chondroprotection with chondroitin sulfate**. Drugs Exp Clin Res 1991; 17(1):3-7
- SCOTT J. E. **Proteoglycan: collagen interactions in dermatosparactic skin an tendon**. An electron hystochemical study using cupromeronic blue in a critical electrolyte concentration method. Matrix 1990; 9(6): 437-42.

STADES, FF. C., BOEVÉ, M. H., LINDE-SPIMAN, J. S. VAN DE EM SANDT, R. R. O.M VAN DE MEM. **Dextran stored homologous grafts for the repair of corneal-scleral defects after the removal of limbal melanomas in four dogs.** Trans. Am. Coll. Vet. Ophthalmol./Int. Soc. Vet. Ophthalmol. Scottsdale, Arizona, USA, **24**: 24, 1993.

ZAR J.H. **Biostatistical analysis.** New Jersey: Prentice Hall; 1996. 718p.

## ANEXO I

Tabela 7 – Posologia dos tratamentos utilizados:

Tratamento	Posologia	Forma farmacêutica	Período avaliado
1) Ciloxan®	1 gota de 6 em 6 horas.	colírio	7, 14, 21 e 42 dias.
2) Ciprovet®	1 gota de seis em seis horas.	colírio	7, 14, 21 e 42 dias.
3) Girassol+ ciprofloxacino em colírio.	1 gota de doze em doze horas.	colírio	7, 14, 21 e 42 dias.
4) Girassol+ ciprofloxacino em pomada.	1 aplicação de doze em doze horas.	Pomada oftálmica.	7, 14, 21 e 42 dias.

Tabela 8 - Comparação de preços finais ao consumidor:

Tratamento	Custo (R\$)
Ciprovet®	56,00*
Ciloxan®	13,46*
Cipro+girassol colírio	8,00*
Cipro+girassol pomada	7,40*

\* Preço médio em estabelecimentos comerciais em Curitiba referente ao mês 08/2005; custo total ao final do período de 42 dias de tratamento por animal tratado.

Foto 1 : Medicamentos utilizados no experimento:

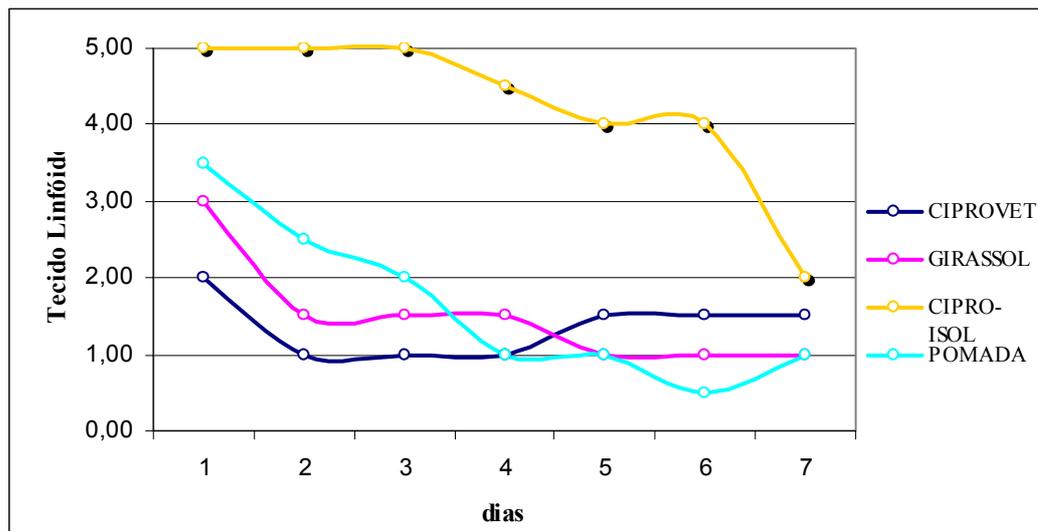


Foto 2: Teste de Schirmer realizado no pré - experimento para doseamento dos produtos desenvolvidos:

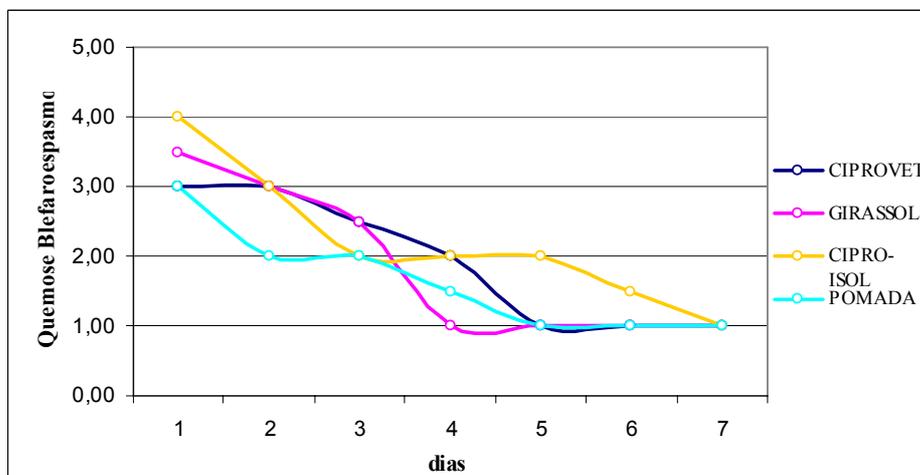


## ANEXO II

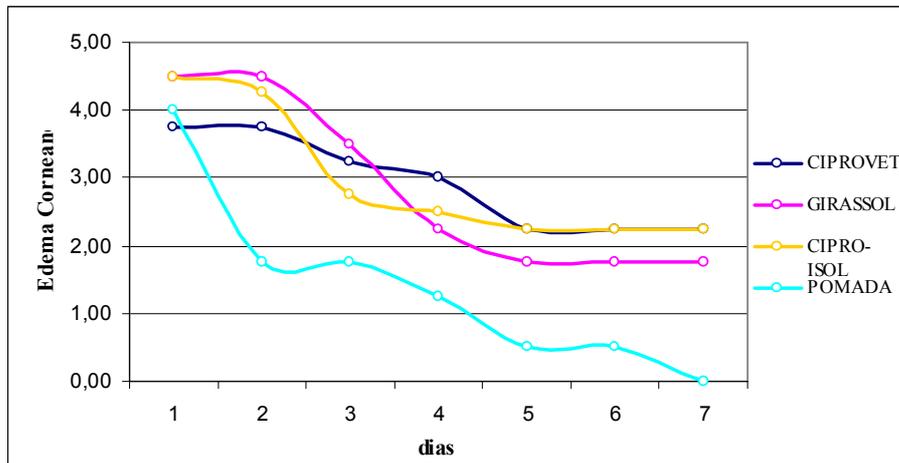
**Gráfico 2** – Evolução mediana dos tratamentos para o parâmetro de avaliação clínica do **Tecido Linfóide**, segundo o protocolo de (MUNGER, 2002), com sete dias de intervalo.



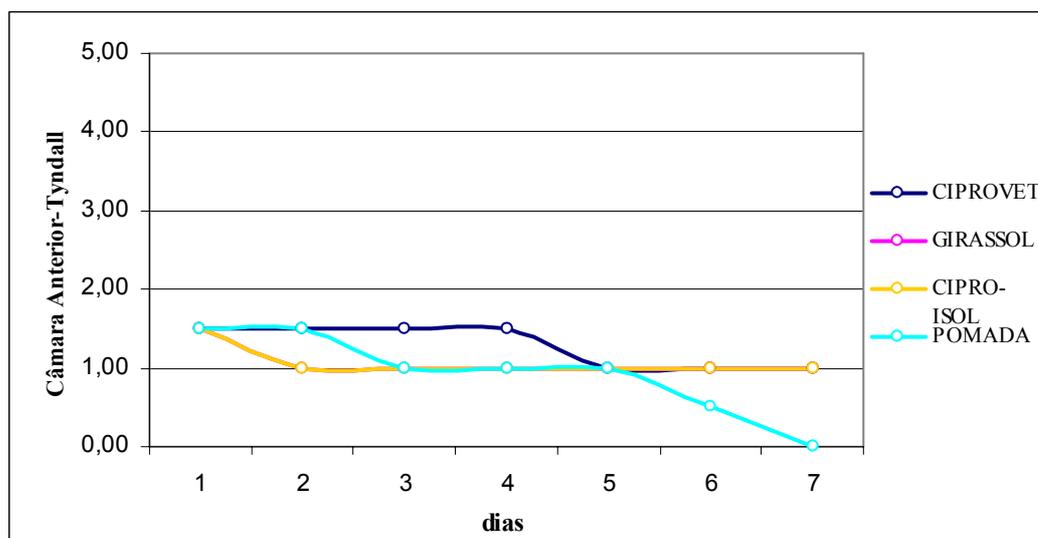
**Gráfico 3** – Evolução mediana dos tratamentos para o parâmetro de avaliação clínica da **Quemose e Blefaroespasm**, segundo o protocolo de (MUNGER, 2002), com sete dias de intervalo.



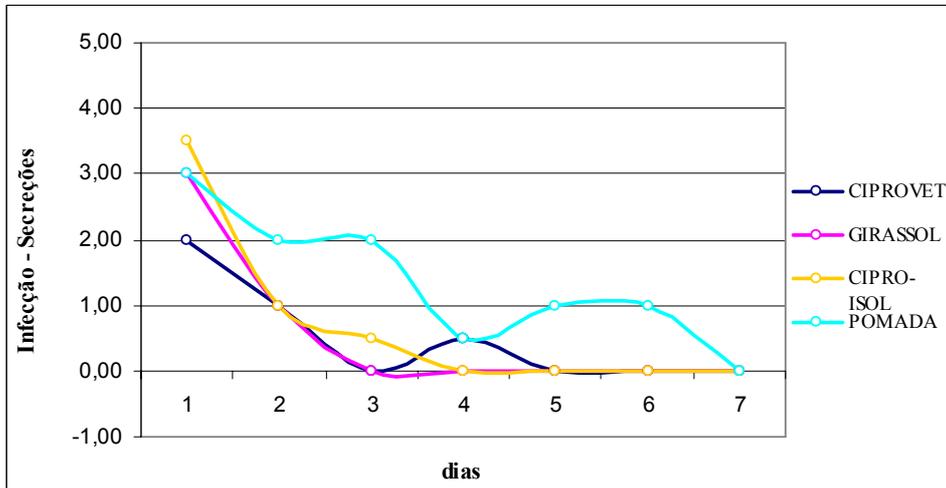
**Gráfico 4** – Evolução mediana dos tratamentos para o parâmetro da avaliação clínica do **Edema corneano**, segundo o protocolo de (MUNGER, 2002), com sete dias de tratamento.



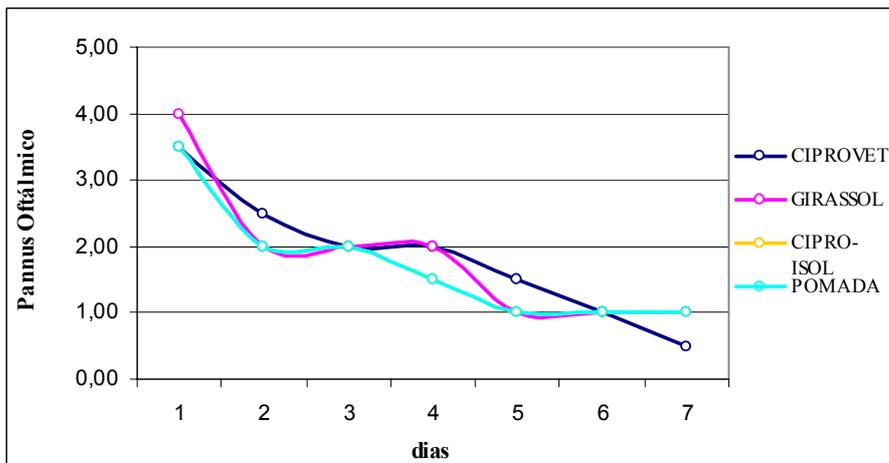
**Gráfico 5** – Evolução mediana dos tratamentos para o parâmetro de avaliação clínica da **Câmara anterior (Tyndall)**, segundo o protocolo de (MUNGER, 2002), com sete dias de intervalo.



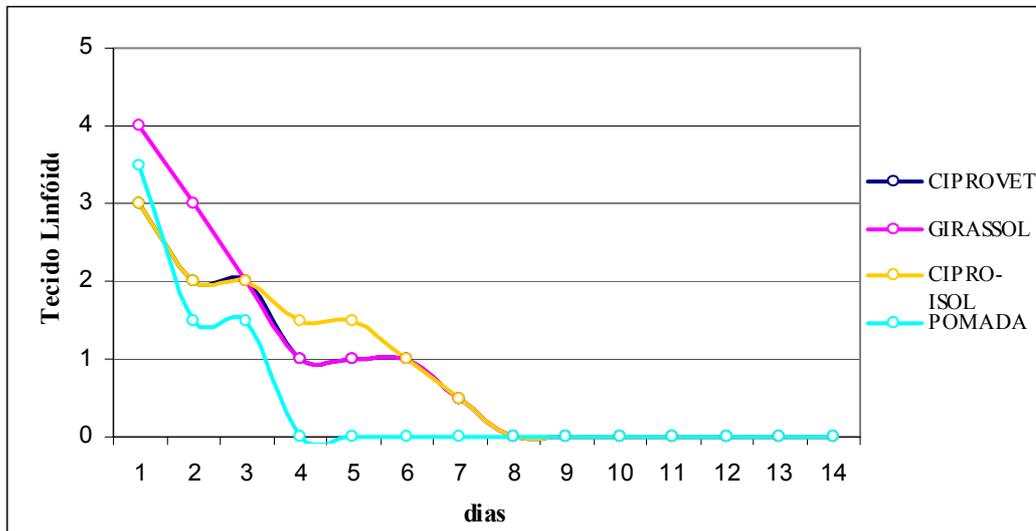
**Gráfico 6** – Evolução mediana dos tratamentos para o parâmetro de avaliação clínica quanto a presença de **infecção e ou secreções**, segundo o protocolo de (MUNGER, 2002), com sete dias de intervalo.



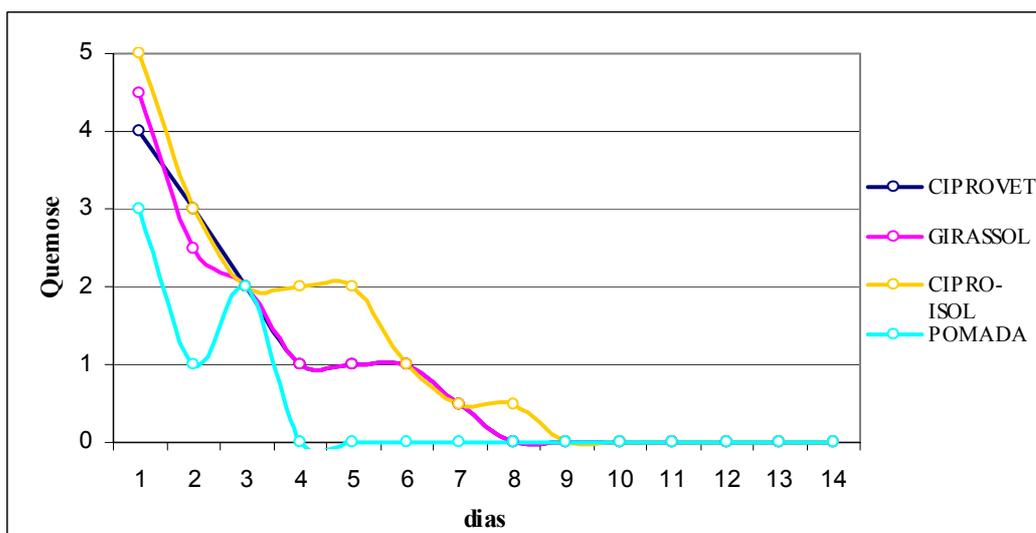
**Gráfico 7** – Evolução mediana dos tratamentos para o parâmetro de avaliação clínica quanto a presença de **Pannus oftálmico**, segundo o protocolo de (MUNGER, 2002), com sete dias de intervalo.



**Gráfico 9** – Evolução mediana dos tratamentos, sob o exame clínico do **Tecido Linfóide**, em 14 dias de tratamento, sob o protocolo de (MUNGER, 2002).



**Gráfico 10** – Evolução mediana dos tratamentos, sob o quesito de avaliação clínica da **Quemose e Blefaroespasma** em 14 dias de tratamento, sob o protocolo de (MUNGER, 2002).







### Anexo III

#### Procedimento cirúrgico:



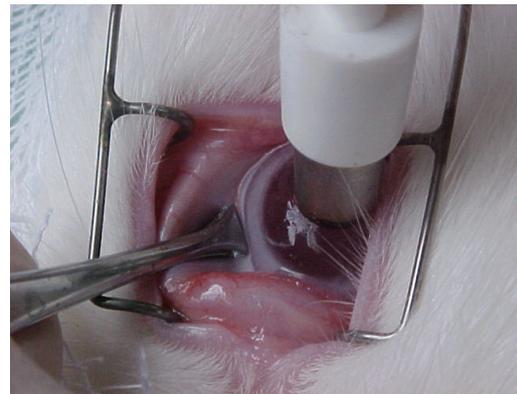
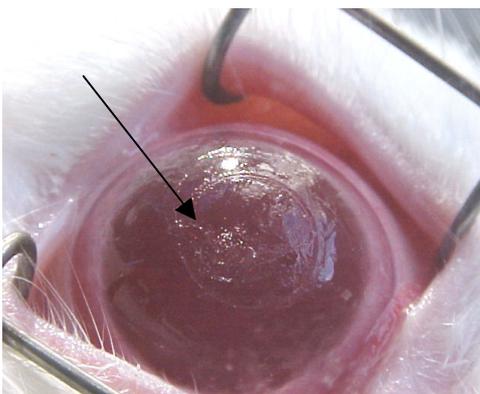
**Figura 1A:** Animais em quarentena pré-operatória.

**Figura 1B:** Material cirúrgico utilizado no procedimento.



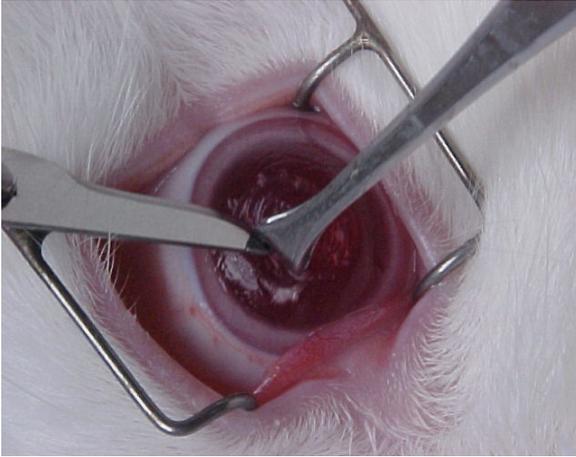
**Figura 2A:** Instilação de colírio anestésico no pré-operatório.

**Figura 2B:** Globo ocular anestesiado para a demarcação da D.M.P.

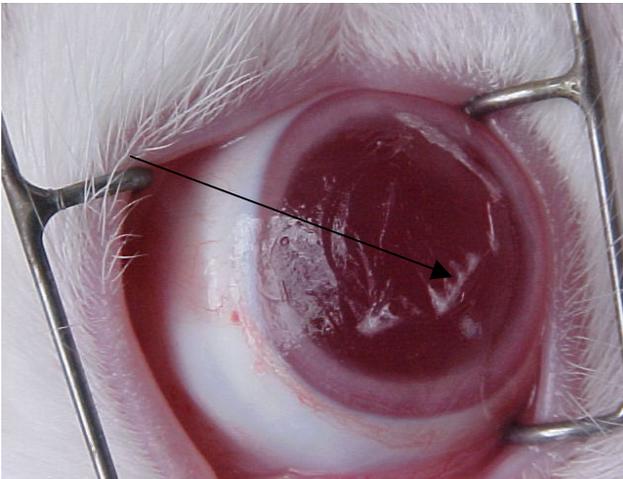


**Figura 3A:** Seta indicando a demarcação subjetiva da distância da margem pupilar (DMP) para a incisão.

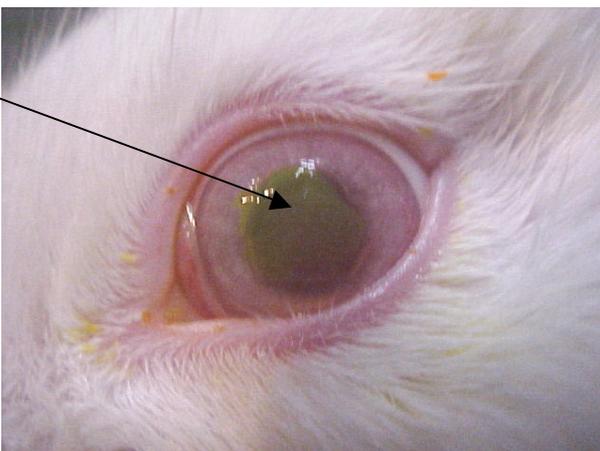
**Figura 3B:** Trefinação em região central do globo ocular (ceratectomia)



**Figura 4:** Remoção do flap corneano delimitado com auxílio do bisturi.



**Figura 5:** Seta indicando área ceratectomia finalizada, com anfractuosidades retiradas na seqüência do processo cirúrgico.

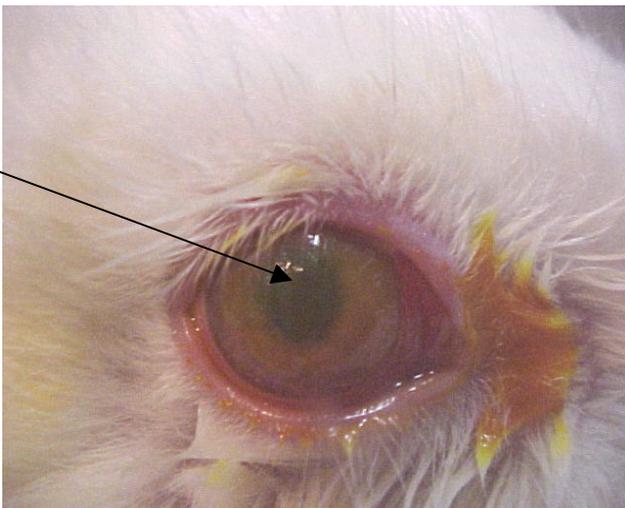


**Figura 6:** Seta indicando úlcera corneana corada por fluoresceína 18 horas após ceratectomia.

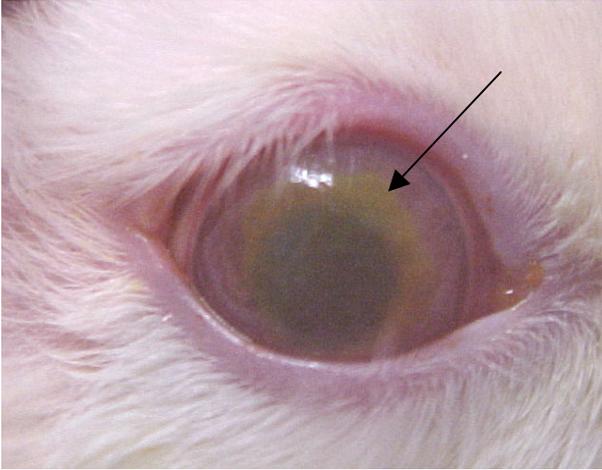
**Avaliação clínica do grupo ciprofloxacino isolado (controle):**



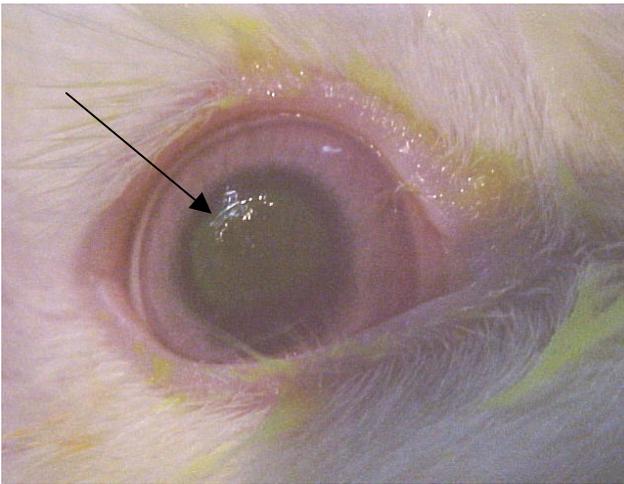
**Figura 7:** Seta indicando úlcera corneana 24 horas (primeiro dia) após a ceratectomia, demonstrando grande área corada por fluoresceína, quemose, edema corneano, blefaroespasmos, fotofobia intensos.



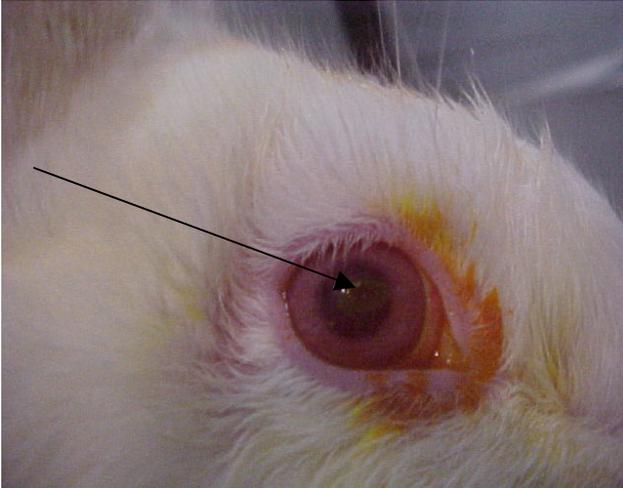
**Figura 8:** Seta indicando úlcera corneana 48 horas (segundo dia) após a ceratectomia visualizamos uma diminuição na quemose palpebral, diminuição na área corada pela fluoresceína, contudo, o blefaroespasmos, edema de córnea e fotofobia presentes com moderada intensidade.



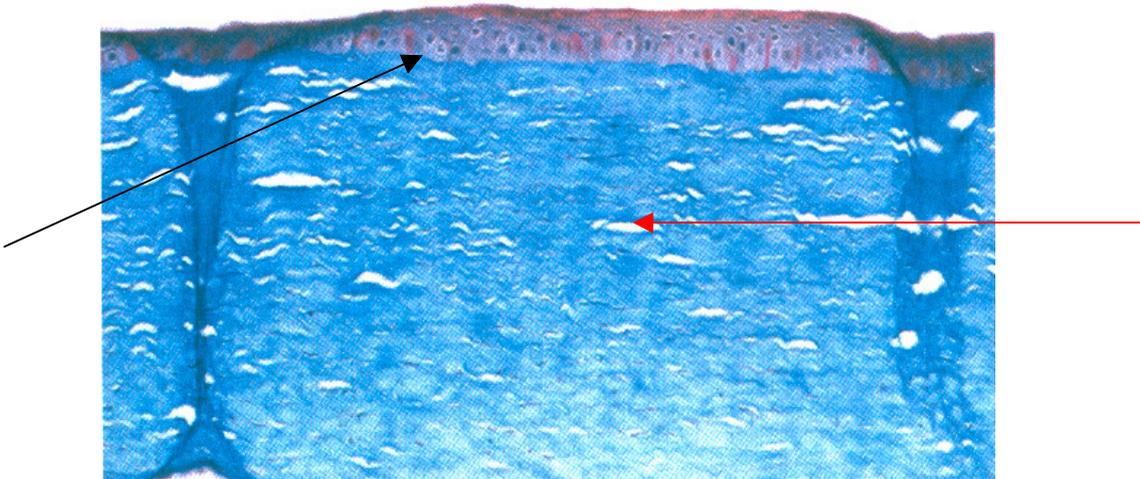
**Figura 9:** Seta indicando úlcera corneana 72 horas (Terceiro dia) após a ceratectomia, visualizamos pouca alteração no quadro clínico do animal em comparação ao dia anterior, salvo pela redução da fotofobia, blefaroespasma e quemose palpebral.



**Figura 10:** Seta indicando úlcera corneana 120 horas (quinto dia) após a ceratectomia percebemos uma melhora significativa no exame clínico, com redução positiva em todos os parâmetros avaliados, mas com reminiscências de fluoresceína, sinalizando uma cicatrização ainda não finalizada.

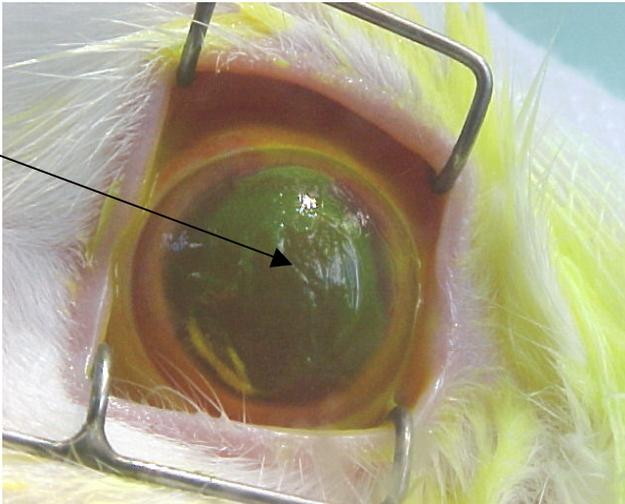


**Figura 11:** Seta indicando úlcera corneana cicatrizada, com 168 horas (sétimo dia) após a ceratectomia, percebemos o teste negativo de fluoresceína e o desaparecimento dos sinais clínicos avaliados, como mostram os dados, 80% dos animais cicatrizaram as úlceras com sete dias de tratamento e o restante com até 48 horas após esta data.

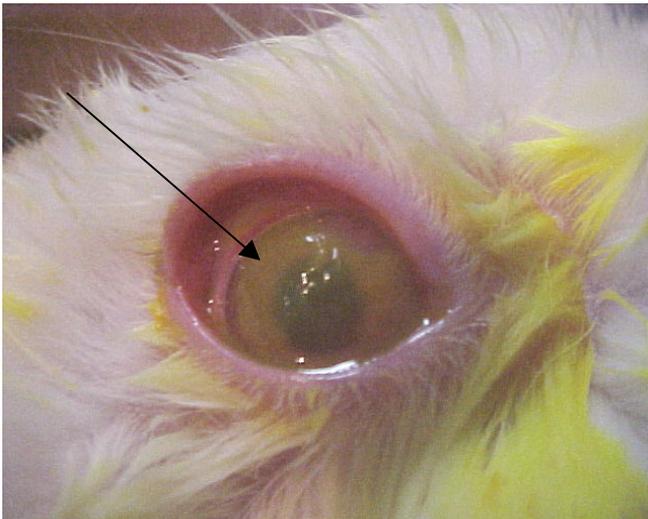


**Figura 12:** Fotomicrografia corneana do olho tratado com sete dias de avaliação, com destaque para o intenso edema estromal (seta 1) e desarranjo lamelar (seta 2), com maior incidência nas proximidades da membrana basal epitelial (seta 3). (tricroômico de Masson, 200X).

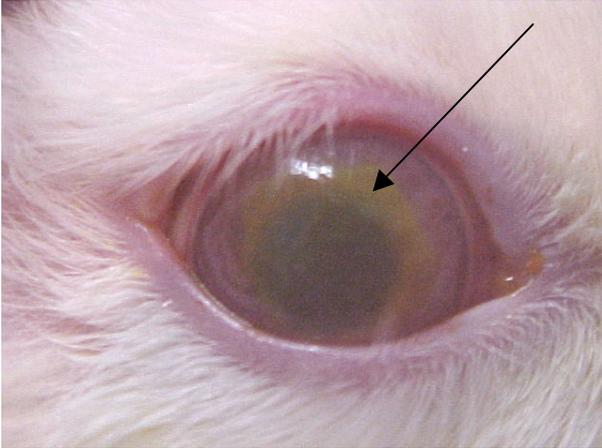
**Avaliação clínica do grupo ciprofloxacino 0,3% + condroitina 20%:**



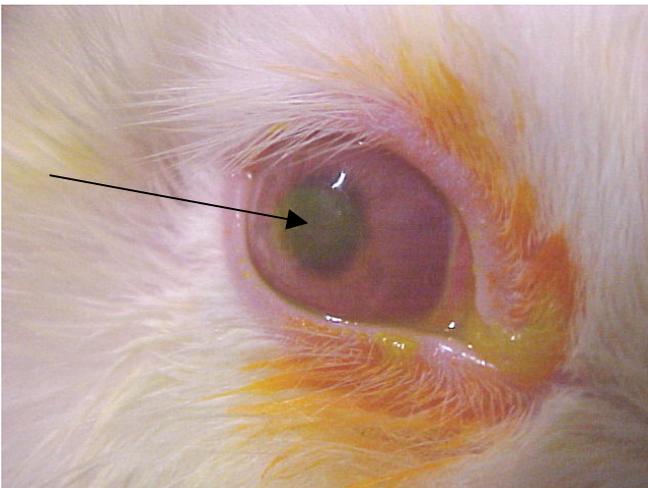
**Figura 13:** Seta indicando úlcera corneana 24 horas (primeiro dia) após a ceratectomia, demonstrando grande área corada por fluoresceína, quemose intensa, edema corneano, blefaroespasmos e fotofobia intensos.



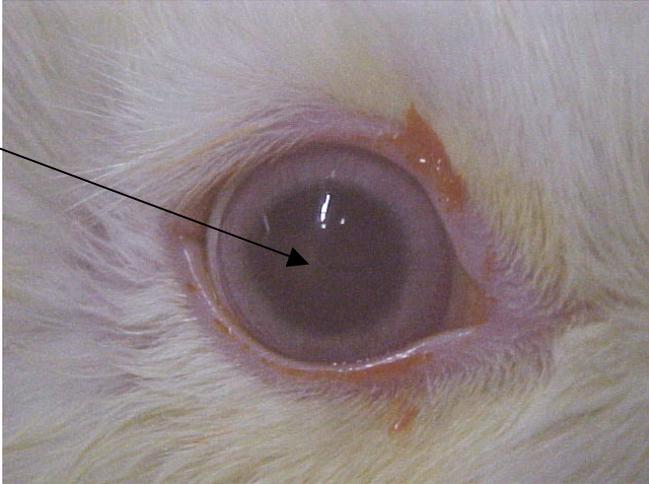
**Figura 14:** Seta indicando úlcera corneana 48 horas (segundo dia) após a ceratectomia visualizamos uma diminuição significativa na área corada pela fluoresceína e no edema corneano. O blefaroespasmos e fotofobia apresentam-se diminuídos, contudo percebemos quemose importante presente neste animal.



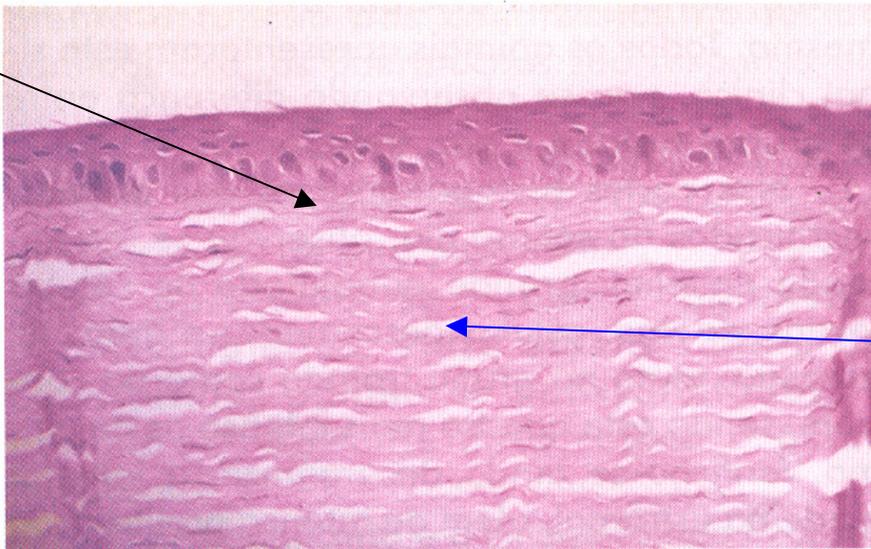
**Figura 15:** Seta indicando úlcera corneana 72 horas (Terceiro dia) após a ceratectomia, visualizamos uma expressiva melhora no quadro clínico do animal em comparação ao dia anterior, contudo o teste de fluoresceína foi positivo em todos os animais.



**Figura 16:** Seta indicando úlcera corneana 120 horas (quinto dia) após a ceratectomia percebemos uma melhora significativa no exame clínico, com redução positiva em todos os parâmetros avaliados, mas com reminiscências de fluoresceína, sinalizando uma cicatrização ainda não finalizada.

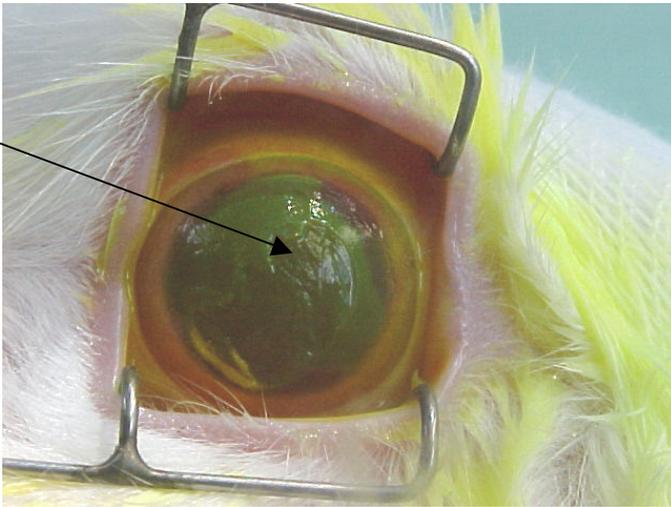


**Figura 17:** Seta indicando úlcera corneana cicatrizada, com 168 horas (sétimo dia) após a ceratectomia, percebemos o teste negativo de fluoresceína e o desaparecimento dos sinais clínicos avaliados, como mostram os dados, 60% deste grupo cicatrizou com seis dias de tratamento, sendo que 100% cicatrizaram com sete dias de tratamento.

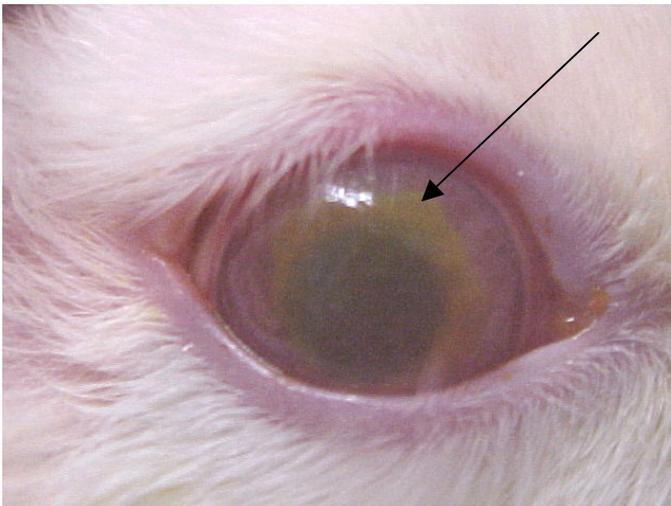


**Figura 18:** Fotomicrografia corneana do olho tratado com sete dias de avaliação, com destaque para o arranjo mais organizado da camada lamelar (seta 1), em detrimento ao grupo anterior, observa-se uma maior presença de fibrilas e fibrócitos na camada epitelial (seta 2). (HE, 200X).

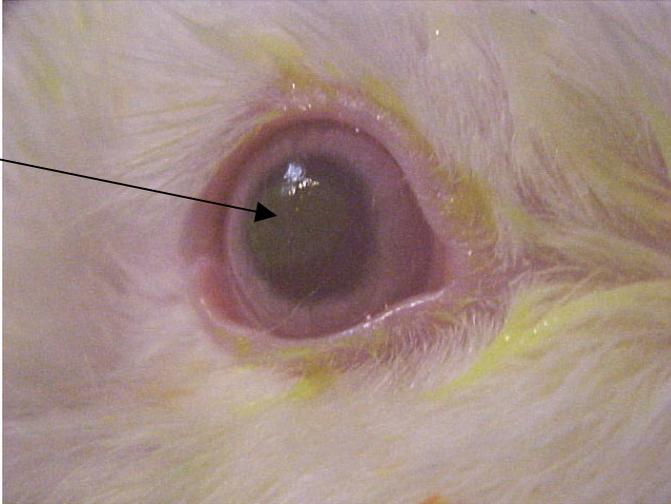
**Avaliação clínica do grupo ciprofloxacino 0,3% + óleo de girassol:**



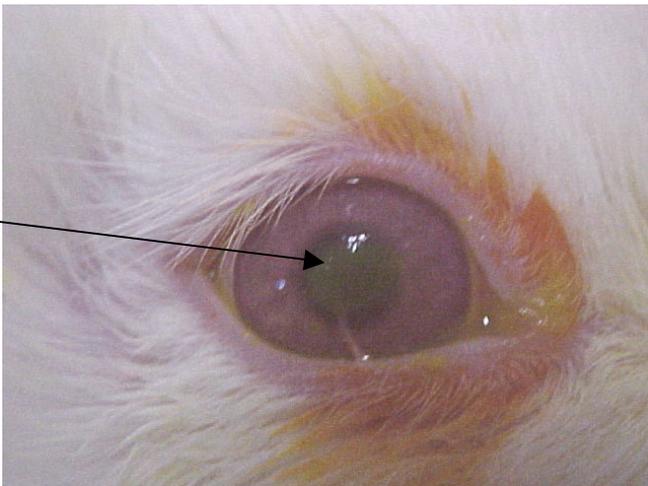
**Figura 19:** Seta indicando úlcera corneana 24 horas (primeiro dia) após a ceratectomia, demonstrando grande área corada por fluoresceína, quemose, edema corneano, blefaespasmo e fotofobia intensos.



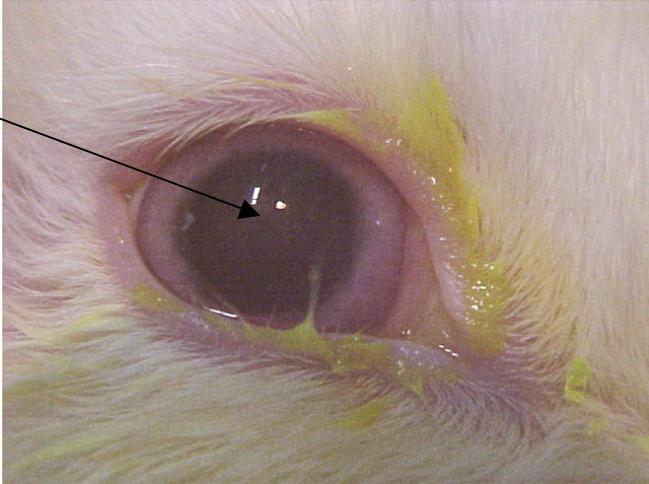
**Figura 20:** Seta indicando úlcera corneana 48 horas (segundo dia) após a ceratectomia visualizamos uma diminuição significativa na quemose palpebral, diminuição significativa na área corada pela fluoresceína, contudo, estavam presentes blefaroespasmo e fotofobia, o edema de córnea estava significativamente diminuído.



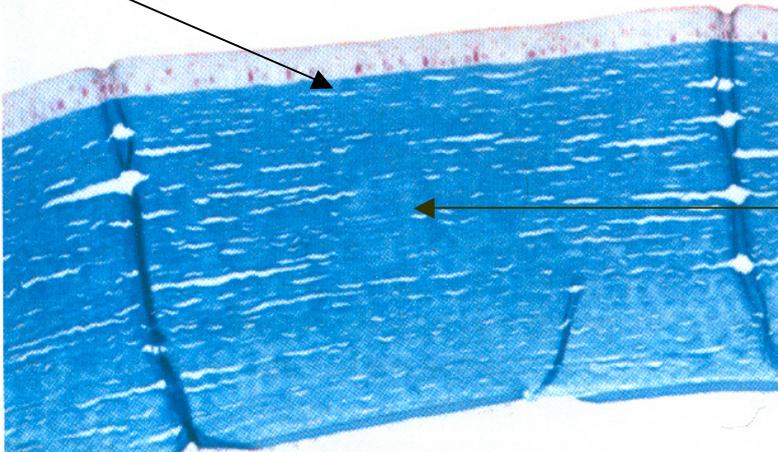
**Figura 21:** Seta indicando úlcera corneana 72 horas (Terceiro dia) após a ceratectomia, visualizamos uma diminuição importante na área corada pela fluoresceína, neste grupo 40% dos animais apresentaram teste de fluoresceína negativo ao terceiro dia de tratamento, com diminuição do blefaroespasma, quemose palpebral e fotofobia, ausência de secreções e edema corneano discreto.



**Figura 22:** Seta indicando úlcera corneana 120 horas (quinto dia) após a ceratectomia percebemos uma melhora significativa no exame clínico, com redução positiva em todos os parâmetros avaliados, neste grupo 90% dos animais apresentaram teste de fluoresceína negativo ao quinto dia de avaliação e tratamento.



**Figura 23:** Seta indicando úlcera corneana cicatrizada, com 168 horas (sétimo dia) após a ceratectomia, percebemos o teste negativo de fluoresceína e o desaparecimento dos sinais clínicos avaliados, neste grupo todos aos animais apresentaram teste negativo de fluoresceína no sexto dia de tratamento.

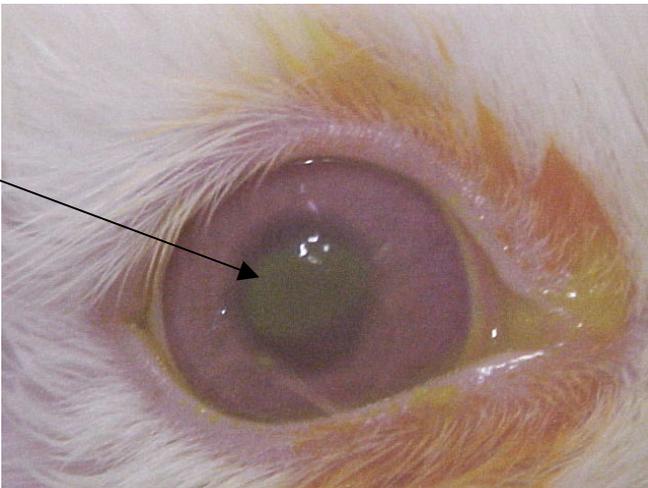


**Figura 24:** Fotomicrografia corneana do olho tratado com sete dias de avaliação, percebemos que existe um epitélio mais bem organizado (seta 1) que nas lâminas anteriores, com arranjo lamelar normalizado (seta 2). (tricroômico de Masson, 200X).

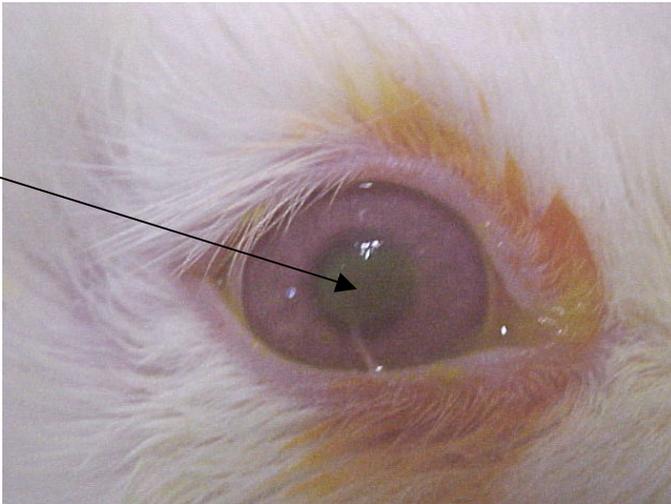
**Avaliação clínica do grupo ciprofloxacino 0,3% + óleo de girassol em pomada oftálmica:**



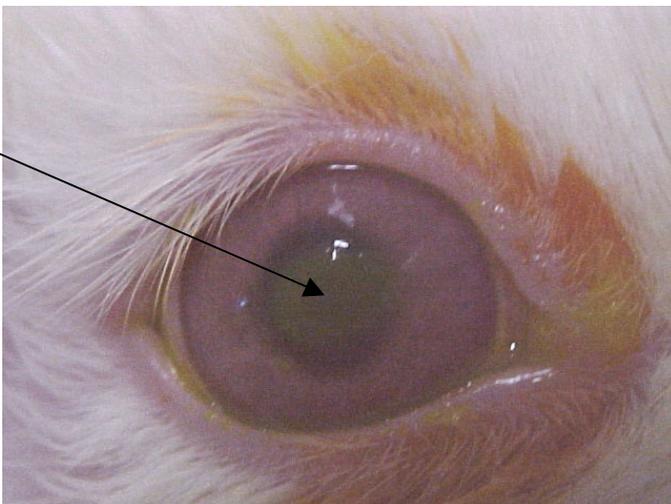
**Figura 25:** Seta indicando úlcera corneana 24 horas (primeiro dia) após a ceratectomia, demonstrando, a exemplo dos grupos anteriores, grande área corada por fluoresceína, quemose, edema corneano, blefaespasmo e fotofobia intensos.



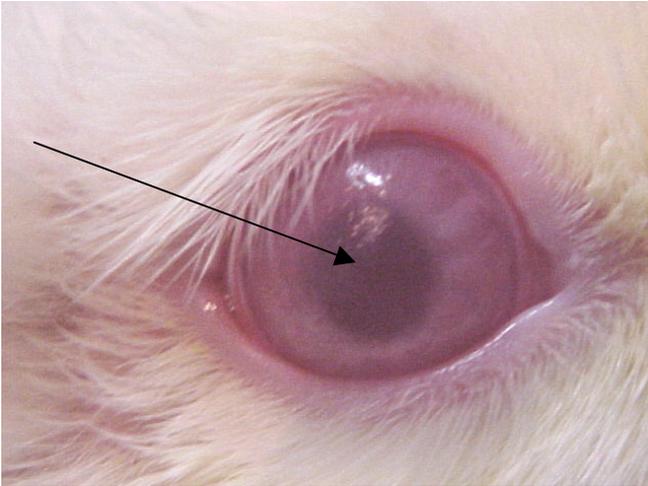
**Figura 26:** Seta indicando úlcera corneana 48 horas (segundo dia) após a ceratectomia visualizamos uma diminuição significativa na quemose palpebral, diminuição significativa na área corada pela fluoresceína, contudo, estavam presentes blefarespasmo e fotofobia, o edema de córnea estava significativamente diminuído, a exemplo do grupo anterior.



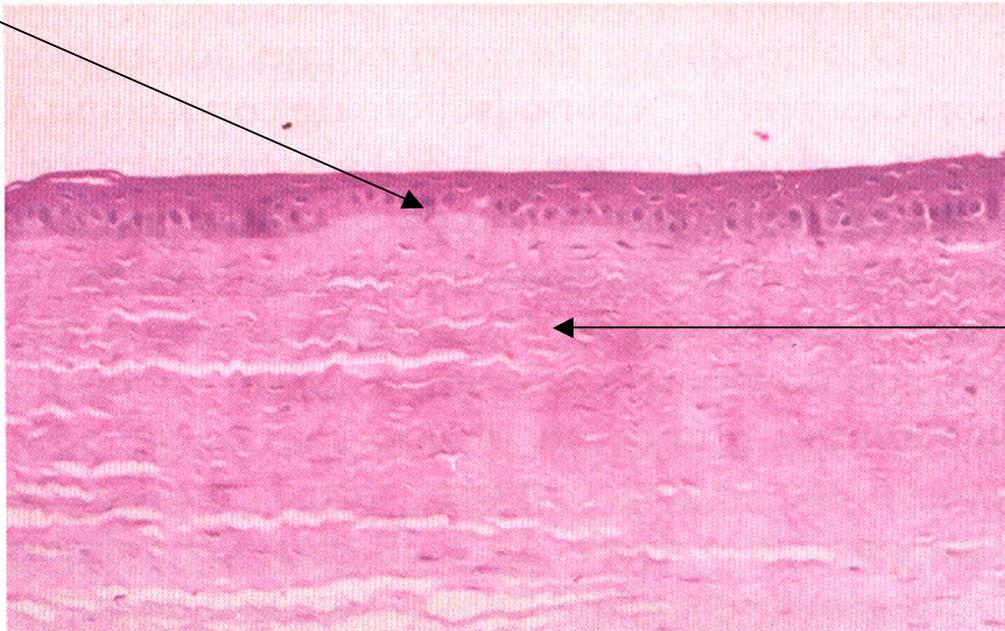
**Figura 27:** Seta indicando úlcera corneana 72 horas (Terceiro dia) após a ceratectomia, visualizamos uma diminuição importante na área corada pela fluoresceína, neste grupo 45% dos animais apresentaram teste de fluoresceína negativo ao terceiro dia de tratamento, com diminuição do blefaroespasma, quemose palpebral e fotofobia, ausência de secreções e edema corneano discreto, a exemplo do grupo anterior.



**Figura 28:** Seta indicando úlcera corneana 120 horas (quinto dia) após a ceratectomia percebemos uma melhora significativa no exame clínico, com redução positiva em todos os parâmetros avaliados, neste grupo 100% dos animais apresentaram teste de fluoresceína negativo ao quinto dia de avaliação e tratamento.

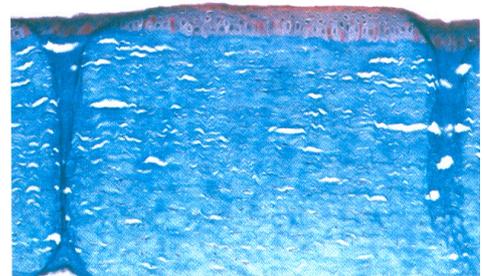
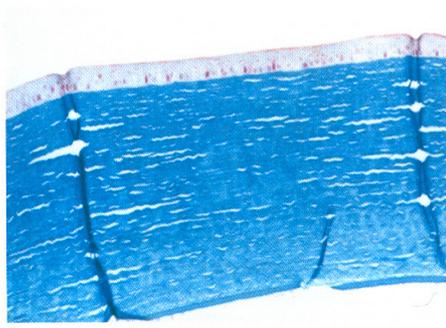
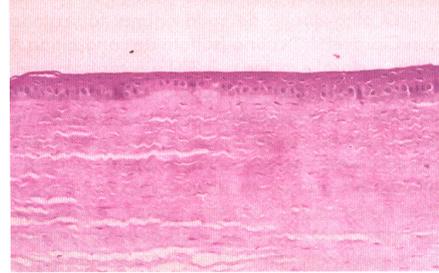
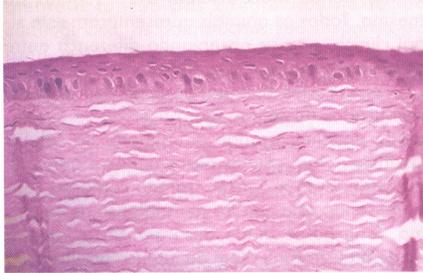


**Figura 29:** Seta indicando úlcera corneana cicatrizada, com 168 horas (sétimo dia) após a ceratectomia, percebemos o teste negativo de fluoresceína e o desaparecimento dos sinais clínicos avaliados, neste grupo todos aos animais apresentaram teste negativo de fluoresceína no quinto dia de tratamento.



**Figura 30:** Fotomicrografia corneana do olho tratado com sete dias de avaliação, com destaque para o arranjo mais organizado da camada lamelar (seta 1), em detrimento aos grupos anteriores, observa-se uma maior presença de fibrilas e fibrócitos na camada epitelial (seta 2). (HE, 200X).

**Figura 31:** Fotomicrografias em painel para comparação múltipla de panoramas reparativos:



**Da esquerda para a direita:** foto 1 grupo ciprovet; foto 2 grupo pomada; foto 3 grupo colírio e foto 4 grupo ciprofloxacino isolado aos sete dias de tratamento.

## ANEXO IV

### Laudos Anatomo-patológicos:

Dra Cláudia Ferreira dos Santos

CRMV-SP 9231

R. Apinagés, 2032 - Pompéia - CEP: 01258-000  
Fone: 3672-9440 - Cel. 9916-2741 / 9189-2973

#### PATOLOGIA GERAL – DERMATOPATOLOGIA – CITOLOGIA – NECRÓPSIA



#### HISTÓRICO DO ANIMAL

Nome: Marcos Batista

Material: Globos oculares de coelho.

---

#### LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

##### Avaliação macroscópica:

Globo ocular (frasco 1 - tratamento ciprofloxacino isolado)  
Fragmento ovalado de 4,0 x 2,5 cm, recoberto com pele e pêlos. Ao corte, consistência fibro-elástica, esbranquiçada e nodular.

#### LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

Avaliação macroscópica: Imagens fotográficas.

Técnica histológica: Hematoxilina & Eosina.

##### Avaliação microscópica:

Camada epitelial anterior formada por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, com área focal na porção média de descontinuidade epitelial. Estroma com dilatação vascular e infiltrado inflamatório composto de células mononucleares e poucos polimorfonucleares na proximidade da junção córneo-escleral. Reduzida presença de celularidade e eosinofilia estromal na porção córneo-escleral. Nos cortes da camada epitelial próximo à área de descontinuidade, ocorre uma grande quantidade de células jovens, edema, células descamadas e áreas de abrasão. Na porção média perilesional, verifica-se a presença, tanto no meio intra como extracelular, de edema próximo à membrana basal, caracterizado pela coloração pálida do citoplasma celular e das áreas não preenchidas por epitélio. Esta amostra também apresentou intensa desorganização lamelar próxima à área de descontinuidade epitelial e edema estromal, associados à reduzida proliferação de fibrocitos e fibrilas de colágeno. Assim como a presença de neovascularização e de polimorfonucleares adjacentes a área de descontinuidade epitelial.

Dra Cláudia Ferreira dos Santos

CRMV-SP 9231

R. Apinagés, 2032 - Pompéia - CEP: 01258-000

Fone: 3672-9440 - Cel. 9916-2741 / 9189-2973

## PATOLOGIA GERAL – DERMATOPATOLOGIA – CITOLOGIA – NECRÓPSIA



### HISTÓRICO DO ANIMAL

Nome: Marcos Batista

Material: Globos oculares de coelho.

---

### LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

#### Avaliação macroscópica:

Globo ocular (frasco 2 - tratamento ciprofloxacino + condroitina A):  
Fragmento ovalado de 3,8 x 2,4 cm, recoberto com pele e pêlos. Ao corte, consistência fibro-elástica, esbranquiçada e nodular.

### LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

Avaliação macroscópica: Imagens fotográficas.

Técnica histológica: Hematoxilina & Eosina.

#### Avaliação microscópica:

Camada epitelial anterior formada por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, com área focal na porção média característica de atividade regenerativa epitelial. Estroma com dilatação vascular e infiltrado inflamatório composto de células mononucleares e poucos polimorfonucleares na proximidade da junção córneo-escleral. Nos cortes da camada epitelial próximo à área de descontinuidade, ocorre uma grande quantidade de células jovens e células descamadas. Na porção média per cicatricial, verifica-se a presença, tanto no meio intra como extracelular, de discreto edema próximo à membrana basal, caracterizado pela coloração pálida do citoplasma celular e das áreas não preenchidas por epitélio. Esta amostra apresentou discreta desorganização lamelar próxima à área de descontinuidade epitelial, associada à grande proliferação de fibrócitos e fibrilas de colágeno. Assim como a discreta presença de neovascularização e de polimorfonucleares adjacentes a área de descontinuidade epitelial.

Dra Cláudia Ferreira dos Santos

CRMV-SP 9231

R. Apinagés, 2032 - Pompéia - CEP: 01258-000  
Fone: 3672-9440 - Cel. 9916-2741 / 9189-2973

## PATOLOGIA GERAL – DERMATOPATOLOGIA – CITOLOGIA – NECRÓPSIA



### HISTÓRICO DO ANIMAL

Nome: Marcos Batista

Material: Globos oculares de coelho.

---

### LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

#### Avaliação macroscópica:

Globo ocular (frasco 3 - tratamento ciprofloxacino + girassol colírio)  
Fragmento ovalado de 3,8 x 2,0 cm, recoberto com pele e pêlos. Ao corte, consistência fibro-elástica, esbranquiçada e nodular.

### LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

Avaliação macroscópica: Imagens fotográficas.

Técnica histológica: Hematoxilina & Eosina.

#### Avaliação microscópica:

Camada epitelial anterior formada por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, com área focal na porção média característica de atividade regenerativa epitelial. Estroma com dilatação vascular e infiltrado inflamatório composto de células mononucleares e poucos polimorfonucleares na proximidade da junção córneo-escleral. Nos cortes da camada epitelial próximo à área de descontinuidade, ocorre uma grande quantidade de células jovens e células descamadas. Na porção média per cicatricial, verifica-se a presença, tanto no meio intra como extracelular, de discreto edema próximo à membrana basal, caracterizado pela coloração pálida do citoplasma celular e das áreas não preenchidas por epitélio. Esta amostra apresentou discreta desorganização lamelar próxima à área de descontinuidade epitelial, associada à grande proliferação de fibrócitos e fibrilas de colágeno. Assim como a discreta presença de neovascularização e de polimorfonucleares adjacentes a área de descontinuidade epitelial.

Dra Cláudia Ferreira dos Santos

CRMV-SP 9231

R. Apinagés, 2032 - Pompéia - CEP: 01258-000  
Fone: 3672-9440 - Cel. 9916-2741 / 9189-2973

## PATOLOGIA GERAL – DERMATOPATOLOGIA – CITOLOGIA – NECRÓPSIA



### HISTÓRICO DO ANIMAL

Nome: Marcos Batista

Material: Globos oculares de coelho.

---

### LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

#### Avaliação macroscópica:

Globo ocular (frasco 4 - tratamento ciprofloxacino + girassol pomada)  
Fragmento ovalado de 3,9 x 2,3 cm, recoberto com pele e pêlos. Ao corte, consistência fibro-elástica, esbranquiçada e nodular.

### LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

Avaliação macroscópica: Imagens fotográficas.

Técnica histológica: Hematoxilina & Eosina.

#### Avaliação microscópica:

Camada epitelial anterior formada por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, com área focal na porção média, característica de atividade regenerativa epitelial. Estroma com dilatação vascular e infiltrado inflamatório composto de células mononucleares e poucos polimorfonucleares na proximidade da junção córneo-escleral. Nos cortes da camada epitelial próximo à área de descontinuidade, ocorre uma grande quantidade de células jovens e células descamadas. Na porção média per cicatricial, verifica-se a presença, tanto no meio intra como extracelular, de discreto edema próximo à membrana basal, caracterizado pela coloração pálida do citoplasma celular e das áreas não preenchidas por epitélio. Esta amostra apresentou discreta desorganização lamelar próxima à área de descontinuidade epitelial, associada à grande proliferação de fibrócitos e fibrilas de colágeno. Assim como a discreta presença de neovascularização e de polimorfonucleares adjacentes a área de descontinuidade epitelial.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Dra. Cláudia Ferreira dos Santos', written over a light-colored rectangular background.

São Paulo, 07 de junho de 2005.

---

Dra Cláudia Ferreira dos Santos

CRMV-SP 9231

R. Apinagés, 2032 - Pompéia - CEP: 01258-000  
Fone: 3672-9440 - Cel. 9916-2741 / 9189-2973

## PATOLOGIA GERAL – DERMATOPATOLOGIA – CITOLOGIA – NECRÓPSIA



### HISTÓRICO DO ANIMAL

**Nome:** Marcos Batista

**Material:** Globos oculares de coelho.

Comentários:

#### **Aspectos regenerativos:**

As lâminas 2, 3 e 4 apresentaram amostras de tecido com mínimas diferenciações histológicas sob aspectos de regeneração e cicatrização; a lâmina 1 demonstrou um tecido com atividade mitótica presente e com a fase inflamatória intensa, mas com discreta proliferação de fibrilas de colágeno e fibrócitos, em detrimento aos grupos 2,3 e 4.

#### **Aspectos cicatriciais:**

Histologicamente, as lâminas 2,3 e 4 encontram-se em um estágio cicatricial mais avançado em detrimento a lâmina 1. Em suma, as lâminas 2,3 e 4 demonstram um tecido em estágio mais avançado de reparação e cicatrização em comparação à lâmina 1.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Dra. Cláudia', written on a light-colored rectangular background.

São Paulo, 07 de junho de 2005.

